

MURINE DESMOGLEIN 2-MUTANTEN ALS TIERMODELL ZUR UNTERSUCHUNG DER ARRHYTHMOGENEN RECHTSVENTRIKULÄREN KARDIOMYOPATHIE

VALÉRIE HOFÉ

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines
Dr.med.vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors
oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für
Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen
und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch
elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be
reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted,
in any form or by any means, electronic, mechanical,
photocopying, recording, or otherwise, without the prior
written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für
Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der
Justus-Liebig-Universität in Gießen
Betreuer: **Prof. Dr. Martin Bergmann**
und
dem Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie der
Rheinisch-Westfälisch Technischen Hochschule in Aachen
Betreuer: **Prof. Dr. Rudolf Leube**

Murine Desmoglein 2-Mutanten als Tiermodell zur Untersuchung der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr.med.vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Valérie Hofe

Tierärztin aus Mainz

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Bergmann
Prof. Dr. Rudolf Leube

Tag der Disputation: 13.03.2009

Meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung

1. Inhaltsverzeichnis	
1. Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung.....	1
1.1. Plötzlicher Herztod - arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	1
1.2. Glanzstreifen.....	2
1.3. Desmosomen.....	4
1.4. Interaktion der Cadherine mit Plakoglobin und Plakophilin	6
1.5. Genetik - ARVC	6
1.6. Histopathologie - ARVC	7
1.7. Pathogenese - ARVC	8
1.8. Tiermodelle zur Untersuchung von ARVC	10
1.9. Beteiligung der desmosomalen Proteine an der Signaltransduktion.....	11
1.10. Vorarbeiten	12
1.11. Ziele.....	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Material.....	17
2.1.1. Geräte und Gefäße.....	17
2.1.2. Chemikalien	19
2.1.3. Enzyme und Reagenziensätze (Kits)	21
2.1.4. Antikörper.....	22
2.1.5. Puffer für molekularbiologische Arbeiten.....	23
2.1.6. Puffer für die Proteinbiochemie	24
2.1.7. Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz	28
2.1.8. Ansätze der Färbelösungen.....	29
2.1.9. Lösungen für die Elektronenmikroskopie	29

2.2. Methoden	31
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1.1. Präparation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	31
2.2.1.2. Präparation genomischer DNA aus Geweben (außer Schwanzbiopsien)	31
2.2.1.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben	32
2.2.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.1.5. Gelelektrophorese	34
2.2.1.6. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	35
2.2.2. Proteinbiochemische Methoden	36
2.2.2.1. Gesamtproteinisolierung aus tierischen Geweben	36
2.2.2.2. Proteinquantifizierung nach Bradford	36
2.2.2.3. Immunoblot	36
2.2.3. Immunhistologie	38
2.2.3.1. AFA-Fixierung	38
2.2.3.2. Isopentan-Fixierung	39
2.2.3.3. Immunfluoreszenz-Färbung	39
2.2.4. Histologische Methoden	40
2.2.4.1. Formalin-Fixierung und Paraffineinbettung	40
2.2.4.2. Apoptosefärbung (ISOL-Färbung)	43
2.2.5. Elektronenmikroskopie	45
2.2.6. Tierexperimentelle Techniken	45
2.2.6.1. Haltung und Zucht von Labormäusen	45
2.2.6.2. Injektion von Tamoxifen zur Induktion der Cre-Rekombinase	46
3. Ergebnisse	47
3.1. Optimierung der Induzierbarkeit der konditionalen DSG2-Mutanten	47

3.2. Generierung und Genotypisierung einer konstitutiven DSG2 ^{delE4-E6} - Mutante.....	49
3.3. Rekombination des Desmoglein 2-Gens im Herzmuskel.....	56
3.4. Nachweis der rekombinierten DSG2-mRNA.....	58
3.5. Untersuchung des rekombinierten Dsg2-Proteins.....	59
3.6. Makroskopische Veränderungen	60
3.7. Histologie.....	63
3.7.1. Allgemeine Veränderungen	63
3.7.2. Histologische Veränderungen der induzierten konditionalen Mutanten	66
3.7.3. Histologische Veränderungen der konstitutiven DSG2 ^{delE4-E6} -Mutanten.....	67
3.8. Apoptose	70
3.9. Immunfluoreszenz.....	75
3.9.1. Nachweis von Desmoglein 2 in den Glanzstreifen	75
3.9.2. Nachweis der desmosomalen Proteine Plakoglobin, Plakophilin 2 und Desmoplakin in den Glanzstreifen.....	76
3.9.3. Nachweis von N-Cadherin, β -Catenin und Connexin 43 in den Glanzstreifen	78
3.9.4. Kolokalisierung von Desmoglein 2 mit Plakophilin 2 und Desmoplakin.....	80
3.9.5. Kolokalisierung von Desmoglein 2 mit N-Cadherin und β -Catenin.....	83
3.10. Elektronenmikroskopische Untersuchung der DSG2-Mutanten	85
3.11. Immunoblot.....	87
4. Diskussion	91
4.1. Pathologische Aspekte	91
4.2. Signalwege in der Entwicklung von Herzerkrankungen	94
4.3. Die direkte Rolle von Desmoglein 2 in der Apoptose.....	98
4.4. Auswirkungen der DSG2-Mutation auf die desmosomale Adhäsion	100
4.5. Murine Desmoglein 2-Mutanten – ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung von ARVC	103

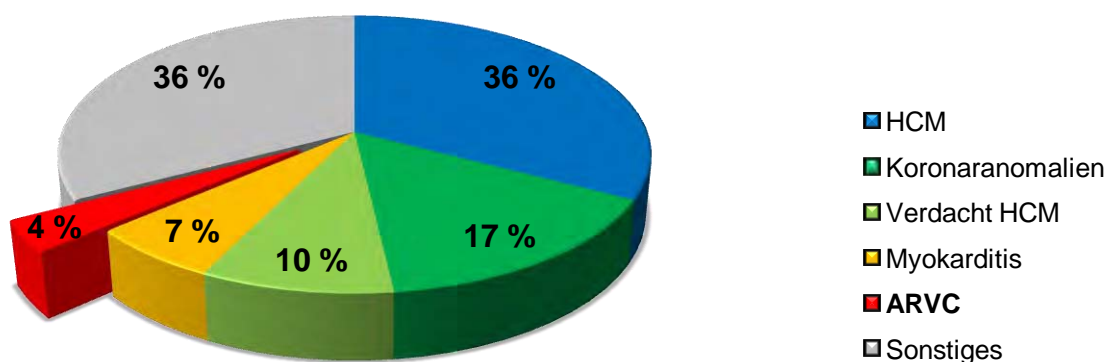
5. Zusammenfassung	105
6. Summary.....	107
7. Literaturverzeichnis	109
8. Abbildungsverzeichnis	112
9. Abkürzungsverzeichnis	121

1. Einleitung

1.1. Plötzlicher Herztod - arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Verebte Herzerkrankungen (Kardiomyopathien) spielen eine bedeutende Rolle im Leistungssport. Jährlich sterben ca. 100 000 Menschen in Deutschland am plötzlichen Herzversagen. In den meisten Fällen sind junge, anscheinend gesunde Leistungssportler betroffen. Faktoren, wie Geschlecht, familiäre Disposition, zunehmendes Alter und gesteigerte Intensität des Sports erhöhen das Risiko eines Leistungssportlers am plötzlichen Herztod zu sterben (DIE ZEIT, 06.09.2007 Nr. 37, DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR SPORTMEDIZIN Jahrgang 56, Nr. 4 (2005)). In den meisten Fällen ist eine unerkannte Herzerkrankung die Ursache. Es werden verschiedene Formen von Herzerkrankungen für den plötzlichen Herztod verantwortlich gemacht. Beispiele sind die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), Koronaranomalien, infektiöse Ursachen, wie die Myokarditis und die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC).

Kardiovaskuläre Ursachen - Plötzlicher Herztod ("sudden cardiac death")



Graphik 1: Kardiovaskuläre Ursachen – Plötzlicher Herztod („sudden cardiac death“) (modifiziert nach Kindermann, DeutscheZeitschrift für Sportmedizin, Nr.4 (2005))

Charakteristisch für diese Erkrankung ist der Ersatz des normalen Herzmuskelgewebes durch Fett- und Bindegewebe. Im Verlauf der Erkrankung kommt es, durch den zunehmenden Funktionsverlust der Herzmuskelzellen zu Störungen in der Erregungsweiterleitung, die sich

in Form von Arrhythmien niederschlagen. Die Herzkammern dilatieren und werden in ihrer Schlagkraft eingeschränkt. Dadurch kann die Sauerstoffversorgung des peripheren Gewebes nur noch unzureichend sichergestellt werden und es kommt zum plötzlichen Bewusstseinsverlust (Synkopen) unmittelbar nach körperlicher Belastung, der im plötzlichen Herztod enden kann.

Weiterhin bezeichnend für diese Erbkrankheit sind anhaltendes Herzklopfen, Tachykardien, ventrikuläre Extrasystolen, schwache R-Wellen und umgedrehte T-Wellen im Elektrokardiogramm. Kommt es nicht zum Tod in frühen Jahren, entwickelt sich eine schwere Herzinsuffizienz (Antoniades et al., 2006; Basso et al., 2006; Grossmann et al., 2004; Markiewicz-Loskot et al., 2007; Pilichou et al., 2006; Sen-Chowdhry et al., 2004; Sen-Chowdhry et al., 2007). Bei den Erbkrankheiten *Naxos disease* und *Carvajal Syndrom* ist die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie gekoppelt an Veränderungen in Haut und Haaren. Charakteristisch für diese Erkrankungen sind Keratosen an Hand- und Fußflächen und wolliges Haar. (Antoniades et al., 2006) (Tsatsopoulou et al., 2006).

Die ursächlichen Mutationen der Erkrankung ARVC liegen in Genen, die für den Zusammenhalt der Herzmuskelzellen essentiell sind. Diese Proteine sind Bestandteil der kardialen Zellverbindungen, den Desmosomen und den Adhärenzverbindungen. Es erkranken bereits heterozygote, mischerbige Träger dieser Mutationen.

1.2. Glanzstreifen

Die kardialen Zellverbindungen befinden sich in den Glanzstreifen. Es sind ineinander verzahnte Zellgrenzen der Kardiomyozyten, die durch einen etwa 20 nm großen Spalt getrennt sind. Diese Zellverbindungen bestehen aus den Adhärenzverbindungen (Fascia adhaerens), den Desmosomen und den Gap junctions. Sie unterscheiden sich infolge ihrer Funktionalität und ihrer Verknüpfung mit dem Zytoskelett der Zelle.

Die gesamten adhäsiven Zellverbindungen im Herzen werden mit dem Begriff „*area composita*“ zusammengefasst (Borrmann et al., 2006; Franke et al., 2007; Grossmann et al., 2004). Demnach bestehen die Zellverbindungen nicht aus Adhärenzverbindungen und einzelnen Desmosomen, sondern bilden eine „*Hybridstruktur*“ aus beiden Komponenten. Die *Area composita* wird als eine Region in den Glanzstreifen des Herzmuskels bezeichnet, die desmosomale Proteine und Proteine der Fascia adhaerens enthält und von cytoplasmatischen Plaquekomponenten umhüllt wird. Sie erscheint als ein verlängertes, fortlaufendes,

junktionales System, welches teilweise durch Gap junctions unterbrochen wird (Borrmann et al., 2006; Franke et al., 2007; Pieperhoff and Franke, 2007). In den Glanzstreifen kommen Proteine der Desmosomen und Proteine der Fascia adhaerens zu gleichen Teilen vor. Durch immunhistologische und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen konnte eine Kolokalisation von Proteinen der Desmosomen (Desmoplakin, Desmoglein 2, Plakophilin 2) mit Proteinen der Fascia adhaerens (N-Cadherin, α -Catenin, β -Catenin) nachgewiesen werden (Borrmann et al., 2006).

In ARVC-Patienten wurden Mutationen in Genen gefunden, die für Komponenten der Desmosomen kodieren (Pilichou et al., 2006).

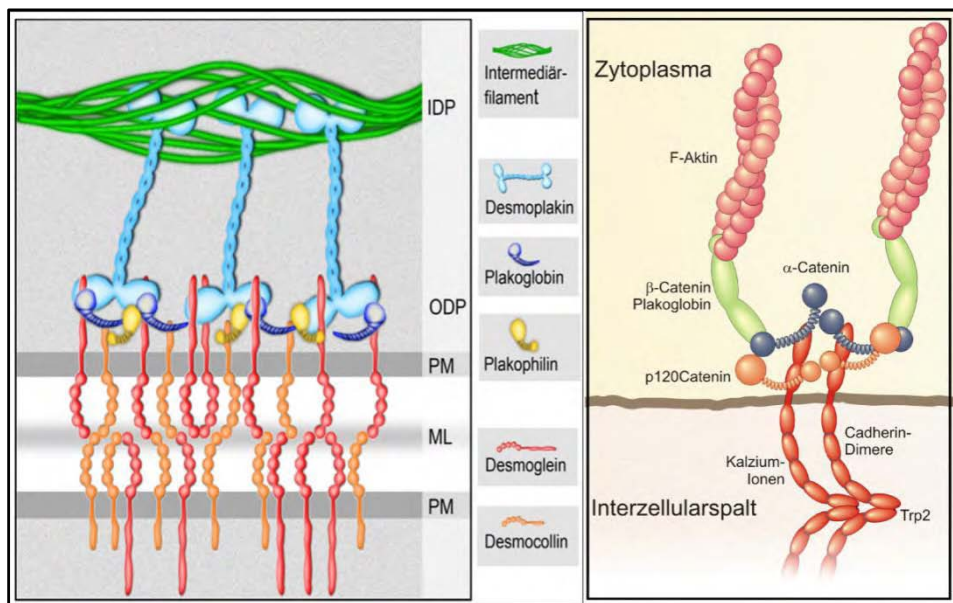


Abbildung 1: vergleichende Übersicht von desmosomalen Haftkomplex und Adhärenzkontakten (Fascia adhaerens): Links-Desmosom: die desmosomalen Cadherine Desmoglein (rot) und Desmocollin (orange) überbrücken den Interzellularspalt und bilden mit ihren Interaktionsdomänen die zentrale Mittellinie (hellgrau). An die carboxyterminalen Domänen der desmosomalen Cadherine binden intrazellulär die Plaqueproteine Plakoglobin (violett) und Plakophilin (gelb) und bilden den äußeren desmosomalen Plaque (ODP). Diese Armadilloproteine interagieren wiederum mit Desmoplakin und verbinden so die membranständigen Proteine mit den lateral einstrahlenden Intermediärfilamenten. IDP: innerer desmosomaler Plaque; ODP: äußerer desmosomaler Plaque; PM: Plasmamembran; ML: Mittellinie **Rechts-Adhärenzkontakt:** Im Interzellularspalt lagern sich die klassischen Cadherine (rot) benachbarter Zellen kalziumabhängig aneinander, wobei die Aminosäure Tryptophan 2 (Trp2) eine wichtige Funktion übernimmt. Die carboxyterminalen Domänen der klassischen Cadherine tragen Bindestellen für die Armadilloproteine α -Catenin (blau) und p120 Catenin (orange). An deren Kopfdomänen binden die Brückenproteine β -Catenin oder γ -Catenin/Plakoglobin (grün), welche ihrerseits die Verbindung zu den Aktinfilamenten (hellrot) herstellen. (Holthöfer, 2007)

1.3. Desmosomen

Die desmosomalen Proteine liegen jeweils in zelltypspezifischen Isoformen vor, was ihnen die Adaption an verschiedene funktionelle und strukturelle Bedürfnisse ermöglicht. Generell

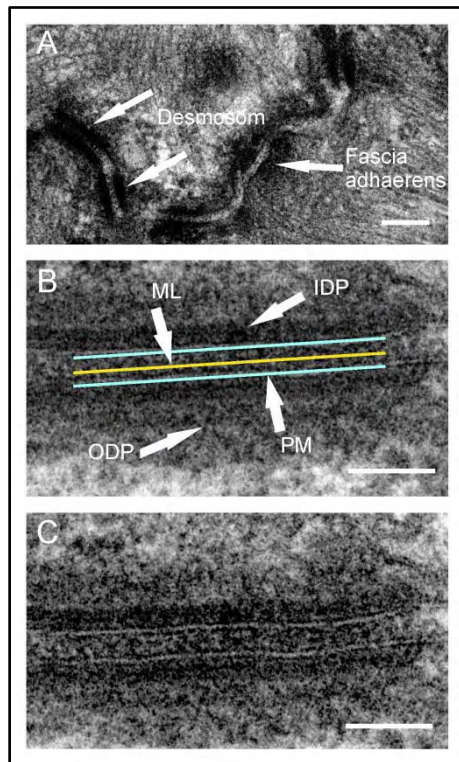


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Desmosomen in den Glanzstreifen des Herzens: A: Übersicht von Desmosomen und Fascia adhaerens B: vergrößerter Schnitt durch einen desmosomalen Haftkomplex (Strukturen farbig unterlegt) C: desmosomaler Haftkomplex ohne farbige Unterlegung; ODP: äußerer desmosomaler Plaque; IDP: innerer desmosomaler Plaque; PM: Plasmamembran (hellblau); ML: Mittellinie (gelb); Größenbalken: 100 nm

befinden sich Desmosomen an strategisch zentralen Positionen der interzellulären Adhäsion und sind an der Ausrichtung der Filamentsysteme benachbarter Zellen beteiligt. Die desmosomalen Cadherine Desmoglein (Dsg) und Desmocollin (Dsc) werden in zelltypspezifischen Isoformen (DSC1-3, DSG 1-4) exprimiert und sind als Transmembran-Glykoproteine direkt an der Interaktion mit den desmosomalen Proteinen der Nachbarzellen beteiligt. Das Cadherin Desmoglein 2 wurde bislang im Herzmuskel als einzige Isoform nachgewiesen. Die angrenzenden Plasmamembranen sind durch einen ca. 24 nm großen Spalt voneinander getrennt und werden im Herzmuskel von den membranumspannenden Desmocadherinen Desmoglein 2 und Desmocollin 2 miteinander verbunden.

Ihre extrazellulären aminoterminalen Anteile bilden in der Mitte des Spaltes die Desmoglea, die sich als elektronendichte Struktur in der Mitte des extrazellulären Bereichs darstellt (Holthofer et al., 2007) (Abbildung 1). Sie umfasst den interzellulären Raum eines Desmosoms, in welchen die extrazellulären Domänen der Desmogleine und Desmocolline hineinragen und heterophile (Dsg/Dsc) und homophile (Dsg/Dsg) *trans*- und *cis*-Dimere bilden (Holthofer et al., 2007). Diese extrazellulären Domänen

sind kalziumabhängig miteinander verbunden (Holthofer et al., 2007). Auf beiden cytoplasmatischen Seiten der Plasmamembranen werden elektronendichte desmosomale Plaques gebildet, die in einem äußeren und einen inneren Plaque unterschieden werden (Abbildung 1). Die cytoplasmatischen Carboxytermini der desmosomalen Cadherine Desmoglein 2 und Desmocollin 2 bilden unter Verankerung mit Plakoglobin, dem N-Terminus des Desmoplakin und Plakophilin 2 den, zur Plasmamembran gelegenen äußeren

intrazellulären Plaques (ODP). Der innere intrazelluläre Plaque (IDP) wird durch einen 10 bis 20 nm breiten elektronenlichten Bereich vom äußeren desmosomalen Plaque getrennt und durch die Interaktion des C-Terminus von Desmoplakin mit den Intermediärfilamenten gebildet (Holthofer et al., 2007). Die aminoterminalen, jeweils 110 Aminosäuren umfassenden extrazellulären Domänen werden als EC1-EC4 benannt (Abbildung 3). Die extrazelluläre Ankerdomäne (EA) bildet die 5. extrazelluläre Domäne (EC5). Zwischen den einzelnen extrazellulären Domänen befinden sich die Bindungsabschnitte für die Kalziumionen, die für die Konformationsbildung verantwortlich sind. In der ersten extrazellulären Domäne (EC1) befindet sich bei den Desmogleinen und Desmocollinen die Zell-Adhäsions-Sequenz mit dem Tryptophan-Rest 2 (Abbildung 3). Beide Proteine besitzen mit der 24 Aminosäuren umfassenden Membrandomäne (TM) einen einzigen Membrandurchgang. Mit der juxtamembranösen Ankerdomäne (IA) beginnt der intrazelluläre Anteil der desmosomalen Cadherine. Auf das intrazelluläre Cadherin-typische Segment (ICS), welches zu vielen Cadherinen eine hohe Sequenzhomologie aufweist und an der das Catenin PG bindet, folgt der *prolin-rich linker* (L) und die „*repeated unit domain*“ (RUD). Diese sich wiederholenden RUD-Sequenzmotive sind für den wesentlich längeren intrazellulären Abschnitt der Desmogleine, im Vergleich zu den Desmocollinen verantwortlich (Holthofer et al., 2007). Am Carboxyterminus des Desmogleins befindet sich noch die Desmoglein-spezifische terminale Domäne (T). Das desmosomale Cadherin Desmocollin kommt in zwei alternativen Spleißvarianten vor (a und b). Bei der Spleißvariante „b“ fehlt die C-Domäne, bzw. die Catenin-Bindungsstelle (ICS) während die „a“-Form kurz nach der C-Domäne endet. Diese zwei Varianten kommen durch unterschiedliches Splicen des letzten Exons zustande (Holthofer et al., 2007).

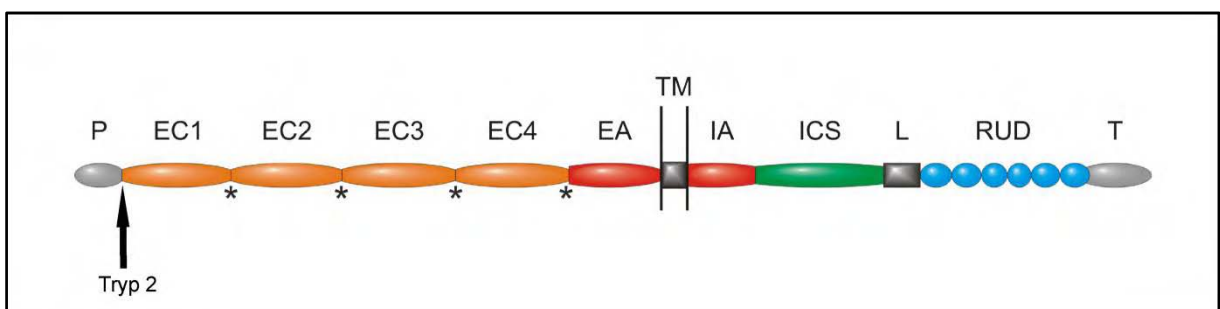


Abbildung 3: Domänenstruktur des desmosomalen Cadherins Desmoglein 2: EC: extrazelluläre Domäne 1 bis 4; EA: extrazelluläre Ankerdomäne; TM: Transmembrandomäne; IA: intrazelluläre Ankerdomäne; ICS: intrazelluläres cadherinartiges Segment; L: Linkerdomäne; RUD: „repeat unit domain“; T: terminale Domäne; *: Kalziumbindetaschen; Pfeilmarkierung: Position von Tryptophan 2 (Hothöfer, 2007)

1.4. Interaktion der Cadherine mit Plakoglobin und Plakophilin

Die molekulare Interaktion der Adhärenzverbindungen und der Desmosomen mit den Aktin- oder Intermediärfilamenten wird über Mitglieder der Armadillo-Proteinfamilie vermittelt (β -Catenin und γ -Catenin/Plakoglobin in Adhärenzverbindungen und Plakoglobin und Plakophilin in Desmosomen). Die Linkerproteine α -Catenin, im Falle von Adhärenzverbindungen und Desmoplakin, bei den Desmosomen, führen zur Verknüpfung mit den Aktin- oder Intermediärfilamenten (Abbildung 1). Plakoglobin kommt in beiden Zellverbindungen vor, den Desmosomen und den Adhärenzverbindungen. Die Gene für die variierenden Plakophiline liegen auf unterschiedlichen Chromosomen und werden in drei Unterfamilien exprimiert (1-3), wobei Plakophilin 2, das am weitesten verbreitete Plakophilin ist (Grossmann et al., 2004). Für die Plakophiline sind alle desmosomalen Hauptkomponenten (Dsg 1-3) potentielle Bindungspartner und sie funktionieren hauptsächlich als „desmosomaler cross-linker“, indem sie Desmoplakin an die Zellgrenze rekrutieren und im Herzen die Verknüpfung von Desmoglein 2 und Desmocollin 2 mit Desmoplakin herstellen. Bei Mutationen im Plakophilin-Gen konnte die Entstehung von cytoplasmatischen Desmoplakinaggregaten, im Zusammenhang mit einer Reduktion der Anzahl und Größe der Desmosomen nachgewiesen werden (Grossmann et al., 2004).

1.5. Genetik - ARVC

Bislang wurden Mutationen in verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen gefunden, bei denen vermutet wird, dass sie die Entstehung der Erkrankung ARVC begünstigen oder verursachen. Generell handelt es sich meist um autosomal dominante Mutationen in den Genen der desmosomalen Proteine. Die Gene folgender Proteine sind nachweislich mutiert: Plakophilin 2 (Grossmann et al., 2004), Plakoglobin (Syrris et al., 2006), Desmoplakin (Yang et al., 2006), Desmocollin 2 und Desmoglein 2 (Moric-Janiszewska and Markiewicz-Loskot, 2007; Pilichou et al., 2006). In jedem dieser Gene sind unterschiedliche Abschnitte betroffen, wobei keine bestimmte Regelmäßigkeit in den Mutationen erkennbar ist.

Die bisher gefundenen Mutationen im DSG2-Gen betreffen hauptsächlich die extrazellulären Domänen des Proteins, wodurch die Ankerstruktur destabilisiert wird und die Bindungseigenschaften verändert werden. Die Mutation im Exon 9, eine Insertionsmutation, führt zum Fehlen der Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen Domäne. Eine Mutation im Exon 14 führt zum Verlust des intrazellulären cadherintypischen Segment,

welches für die Interaktion mit Plakoglobin verantwortlich ist (Pilichou et al., 2006). Weitere Mutationen wurden in den Exonen 13 (Rampazzo et al., 2003; Rampazzo et al., 2002), 3, 8 und 11 (Moric-Janiszewska and Markiewicz-Loskot, 2007) gefunden. Weiterhin wurden eine Nonsense-Mutation im Exon 12, fünf Missense-Mutationen in den Exonen 5 (Abbildung 4) und 8, eine Splice site-Mutation im Exon 12 und zwei Insertions-Deletions-Mutationen in den Exonen 9 und 15 (Pilichou et al., 2006) gefunden. In welcher Weise die bislang gefundenen Mutationen zur Entstehung der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie beitragen, ist noch unklar.

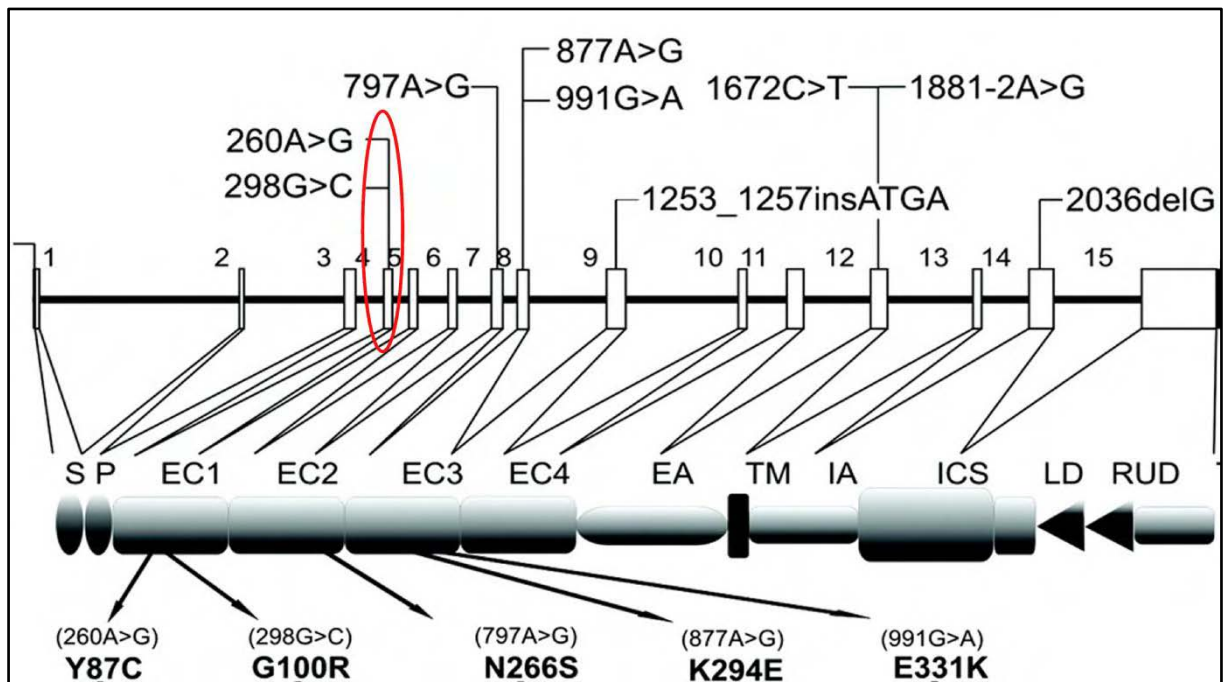


Abbildung 4: Mutationen im Desmoglein 2-Gen, die bislang bei ARVC-Patienten gefunden wurden: Darunter eine Mutation (rote Umrandung) im Exon 5 (Pilichou et al., 2006).

1.6. Histopathologie - ARVC

Besonders bezeichnend für diese Erkrankung ist der Ersatz des normalen Herzmuskelgewebes durch Fett- und Bindegewebe. Histologisch sind fibröses Gewebe, Verfettung, Dysmetrie oder Dysmorphologie der Kerne und Vakuolenbildung zu erkennen (Pilichou et al., 2006). Elektronenmikroskopisch fällt eine Blässe der Glanzstreifen und der inneren desmosomalen Plaques auf. Die Desmosomenanzahl kann vermindert sein. Es treten Desmosomen an untypischen Stellen auf und der prozentuale Anteil der Länge und des Abstands ist herabgesetzt. Weiterhin sind ein geweiteter interzellulärer Abstand, besonders kleine

Junktionen, Zeichen von Apoptose und dicht aggregiertes Chromatin beobachtet worden (Basso et al., 2006; Pilichou et al., 2006; Rampazzo et al., 2003).

1.7. Pathogenese - ARVC

Wie es zur Ausbildung der charakteristischen Merkmale der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie kommt, ist noch weitgehend unbekannt. Bislang wurden nur wenige Theorien zur Pathogenese der Erkrankung veröffentlicht. Es stellt sich die Frage, ob es lediglich durch den Verlust der adhäsiven Eigenschaften und damit der beeinträchtigten desmosomalen Funktion unter den Konditionen des mechanischen Stresses zu Abtrennung und Tod der Kardiomyozyten kommt, oder ob den gleichen Proteinen wichtige regulatorische Funktionen zukommen, die dann über Signalkaskaden zu Veränderungen der Morphologie und der Funktion der Herzmuskelzellen führen. Das größte Rätsel dabei ist, dass viele verschiedene Gene betroffen sind. Diese mutierten Gene verursachen trotz unterschiedlicher Funktionen ARVC mit gleicher Histopathologie (Dokuparti et al., 2005). Wie kann es durch diese unterschiedlichen Mutationen zu einem, in allen Fällen gleichen Bild des bindegewebigen Ersatzes kommen? Dazu gibt es bislang mehrere Theorien. Die „dysontogene Theorie“ (Dokuparti et al., 2005) beschreibt ARVC als eine mildere Form der „*parchment RV*“ oder *Uhl's Anomaly*, die sich in der Kindheit als eine kongenitale Hypoplasie des rechten Ventrikels zeigt. Dabei kommt es zu einer partiellen oder kompletten Abwesenheit des Myokards des rechten Ventrikels. Es wird vermutet, dass es durch eine konstante Apoptose zu einem progressiven Verlust des Myokards kommt. Diese Theorie wird durch die „Apoptosetheorie“ (Mallat et al., 1996) gestützt, welche in einer Fallstudie bei sechs von acht Patienten deutliche Apoptose im rechten Myokard nachweisen konnte, während in den Negativkontrollen keine Auffälligkeiten zu finden waren. Interessant war hier die Tatsache, dass die apoptotischen Myokardzellen in Bereichen gefunden wurden, die noch nicht mit Bindegewebe oder Fettgewebe gefüllt waren. Dieses Ergebnis spricht für einen initialen Prozess in der Entstehung der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (Mallat et al., 1996). Eine weitere Theorie ist die „Transdifferenzierungstheorie“, in welcher die Vermutung angestellt wird, dass die Myokardzellen sich im Verlauf der Erkrankung in Fett- oder Bindegewebszellen umwandeln. Unterstützt wird diese Theorie dadurch dass, in den Muskelzellen von erkrankten Herzen Vimentin und in den Fettzellen Desmin gefunden wurde, welches sonst nur in der jeweils anderen Zellart exprimiert wird (D'Amati et al., 2000).

Interessant ist auch eine Arbeit, die die Rolle von Desmoglein 2 in der Apoptoseregulation im Darm von Mäusen untersucht. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Gesamtmenge von Desmoglein 2 zu Beginn der Apoptose ansteigt und dass es bei einem Abfall von Desmoglein 2 zu einer Reduzierung des programmierten Zelltodes kommt (Nava et al., 2007). Die Spaltung von Desmoglein 2 führt zur Bildung eines C-Terminusstückes, das Caspase 3, ein wichtiges Enzym der Apoptose, hochreguliert und die Zellen für Apoptose sensibilisiert. Weiterhin interessant ist, dass auch hier ein Anstieg der Plakoglobinkonzentration nach Apoptoseinduktion und eine Kolokalisation mit dem Desmoglein 2 C-Terminus zu verzeichnen ist, während alle anderen Interaktionen mit Plaquekomponenten zerstört wurden.

Den wichtigsten Durchbruch in der Aufklärung der Erkrankung ARVC hat bislang Eduardo Garcia-Gras erlangt. In seiner Studie konnte er nachweisen, dass dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg und den beiden Molekülen Plakoglobin und β -Catenin eine bedeutende Rolle in der Entstehung der Erkrankung zukommen (Garcia-Gras et al., 2006). Der Wnt-Signalweg ist nach seinen Liganden benannt, welche als Mediatoren eine wichtige Rolle bei der Entwicklung verschiedener Zellen einnehmen. Durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges über die Bindung der Wnt-Moleküle an Transmembranmoleküle und anschließender Dephosphorylierung und damit Inhibierung eines Degradationskomplexes kommt es zu einer Stabilisierung von β -Catenin, dass dann mit den Transkriptionskomplexen der Tcf/LEF-Familie interagiert und so zur Transkription der Zielgene führt. Zu diesen Zielgenen gehören unter anderem Cyclin D1 und c-Myc. Cyclin D1 gehört zu den Hauptregulatoren für das Eintreten der Zelle in das proliferative Stadium des Zellzyklus, genauso wie c-Myc, welches für den Eintritt der Zelle in die S-Phase verantwortlich sein soll (Shtutman et al., 1999). Außerdem hat c-Myc verschiedene Funktionen in der Zellwachstumsregulation, Zellproliferation und Apoptose. β -Catenin nimmt eine multifunktionale Stellung ein, da es als Strukturprotein α -Catenin mit den Aktinfilamenten verknüpft und über die Aktivierung von Zielgenen als Transkriptionsfaktor agiert. Dieses nicht-junktionale β -Catenin wird unter physiologischen Umständen von einem Ubiquitin-Protease-System degradiert (Zhurinsky et al., 2000). Ist dies aus unterschiedlichen Gründen nicht der Fall, kommt es zu einer Akkumulation von β -Catenin und einer erhöhten Transkriptionsaktivierung, was beispielsweise in der Tumorentstehung eine Rolle spielen kann. Plakoglobin (γ -Catenin) zeigt eine starke Homologie in seiner *arm-repeat*-Domäne zu β -Catenin. Es enthält eine LEF/Tcf-Bindungsdomäne in seinem C-Terminus und ist in der Lage mit diesem Transkriptionsfaktor

einen Komplex zu bilden. Es ist allerdings noch nicht ganz klar, was diese Komplexbildung zur Folge hat. Vermutlich konkurrieren beide Moleküle, um die Bindungsstellen des Tcf/LEF-Transkriptionsfaktor. Bei einer erhöhten Expression von exogenem Plakoglobin könnte es zu einem Verdrängen von β -Catenin aus den Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren kommen (Zhurinsky et al., 2000).

1.8. Tiermodelle zur Untersuchung von ARVC

Um die Pathogenese einer genetisch bedingten Erkrankung nachvollziehen zu können und um eine geeignete Basis zur Erforschung von Medikamenten zu schaffen, ist es unabdingbar, passende Tiermodelle zu generieren. Für die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie sind bislang nur wenige Tiermodelle bekannt.

Zur Erforschung der Beteiligung des β -Catenin/Wnt-Signalwegs auf die Entwicklung der Erkrankung ARVC wurden Desmoplakin-*Knockout*-Mäusen gezüchtet (Garcia-Gras et al., 2006). In diesem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass β -Catenin und Plakoglobin eine kompetitive Wirkung auf den Wnt-Signalweg haben, die durch ihre unterschiedlichen Bindungsstellen im Tcf-Transkriptionsfaktor begründet sein können (siehe auch 1.7.). Durch Immunoblot- und Immunfluoreszenzanalysen konnte bewiesen werden, dass es bei einem Defizit von Desmoplakin zu einem Abwandern von Plakoglobin in den Zellkern kommt und dass die Tcf-vermittelte Gentranskription reduziert wird. Messungen der Expressionslevel der Adipogene Adiponectin und C/EBP- γ und der Expressionslevel der Fibrosegene Col1a2, Col1a1 und Col3a1 ergaben erhöhte Level in den defizienten Zellen und in den *Knockout*-Mäusen. Weiterhin ließ sich feststellen, dass die Zielgene des β -Catenin/Tcf/LEF-Transkriptionskomplexes Cyclin D1 und c-Myc herunter reguliert sind. Diese Ergebnisse (Garcia-Gras et al., 2006) lassen vermuten, dass der Wnt-Signalweg als ein Umschaltregulator von Myogenese zu Fibrose und Adipogenese fungiert und als Schutz vor Apoptose dient. Ein Ungleichgewicht in der exogenen Plakoglobin- und β -Cateninkonzentration führt zu einer starken Suppression des Signalwegs, was wiederum die Adipogenese und Apoptose steigert. Die Gründe für das Abwandern von Plakoglobin in den Zellkern sind unklar. Eine andere Frage ist die Herkunft der Adipozyten. Vielleicht entwickeln sich aus den kardialen Myoblasten oder den mesenchymalen Stammzellen in Abwesenheit des Wnt-Signalweges Adipozyten.

Um die Auswirkungen des Fehlens von Plakophilin 2 auf die Zusammensetzung der Glanzstreifen zu untersuchen (Grossmann et al., 2004), wurden Plakophilin 2-*Knockout*-Mäuse gezüchtet. In diesem Tiermodell konnte beobachtet werden, dass Desmoplakin nicht mit den Plaquekomponenten assoziiert ist, sondern in Form von Aggregaten im Zytoplasma vorliegt, um die teilweise ungeordnete Wirbel von Intermediärfilamenten lagen. Die anderen Proteine (β -Catenin, p120, Plakoglobin) verblieben an den Junktionen der Glanzstreifen. In anderen Geweben, konnte keine Abweichung in der Desmosomenzusammensetzung beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist eventuell das Vorkommen weiterer Plakophiline in anderen Geweben, die das Fehlen von Plakophilin 2 kompensieren können (Grossmann et al., 2004).

1.9. Beteiligung der desmosomalen Proteine an der Signaltransduktion

Bislang durchgeführte Untersuchungen deuten auf zwei unterschiedliche Funktionen der desmosomalen Proteine hin. Zum Einen führen die veränderten Proteine zu einem Verlust der Funktion desselben Proteins (beispielsweise der Verlust der desmosomalen Adhäsion) und zum Anderen wurden in verschiedenen Mutationsanalysen Wachstums- oder Proliferationsveränderungen nachgewiesen, die auf eine Beteiligung der Proteine an Signaltransduktionsvorgängen schließen lassen. Zum Beispiel sterben homozygote *Knockout*-Mäuse, bei denen das desmosomale Protein Desmoglein 2 ausgeschaltet ist, zu einem Zeitpunkt, wo im Trophoblast noch keine desmosomalen Strukturen nachweisbar sind (Eshkind et al., 2002).

Für die Erkrankung ARVC ist bislang nur die Beteiligung des β -Catenin/Wnt-Signalwegs erforscht. Darüber hinaus ist für die desmosomalen Proteine ein Mitwirken in weiteren Signaltransduktionsvorgängen untersucht worden. Plakoglobin scheint außerdem eine Rolle als Repressor des proto-Onkogens c-Myc zu spielen (Williamson et al., 2006). In Plakoglobin-Überexpressions-Untersuchungen wurde festgestellt, dass eine Erhöhung von Plakoglobin zu einer verringerten Proliferation der Epidermiszellen führt (Charpentier et al., 2000). Bei einer Überexpression von Desmoglein 2 kann Plakoglobin seine Aufgabe als Repressor nicht mehr ausreichend ausüben und es kommt zu einer Hyperproliferation der Epidermis (Brennan et al., 2007). Die Verfügbarkeit von Bindungsstellen für Plakoglobin scheint die Plakoglobin-vermittelte Repression von c-Myc zu beeinflussen. Außerdem wurde die Beteiligung desmosomaler Cadherine an den p38-Signaltransduktionswegen beschrieben

(Berkowitz et al., 2006; Holthofer et al., 2007). Untersuchungen mit Autoantikörpern gegen Desmoglein 3 zeigten eine erhöhte Aktivierung der p38-MAPK und Auswirkungen auf die Aktinreorganisation (Berkowitz et al., 2006).

1.10. Vorarbeiten

Im Folgenden wird kurz die Arbeit („Konditionale Mutagenese von Desmoglein 2 in der Maus“) von Dr. Bastian Holthöfer zusammenfassend dargestellt, da sie die Grundlage für diese Promotionsarbeit ist. Ein Ziel dieser Arbeit war die Generierung einer transgenen Mauslinie, in der sich die Exone 4-6 des Desmoglein 2-Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt (konditional) und nur in einem bestimmten Gewebe (hier: Herzmuskelgewebe) herauschneiden und neu rekombinieren lassen.

Es wurde mit Hilfe des Cre/lox-Rekombinationssystems eine transgene Mauslinie gezüchtet, der nach erfolgter mehrtägiger Injektion eines Liganden (Tamoxifen) die Exone 4-6 des Desmoglein 2-Gens fehlen. Um eine Mauslinie zu etablieren, in der die Exone 4-6 des Desmoglein 2-Gens gewebespezifisch induzierbar rekombiniert werden können, mussten von Dr. Holthöfer zuvor mehrere transgene Mauslinien generiert werden. Es wurde eine erste Mauslinie gezüchtet, die Träger des Desmoglein 2-Gens ist, dessen Exone 4-6 durch zwei loxP-Sequenzen flankiert werden (Abbildung 5). Um diese Mäuse herzustellen, hat Dr. Holthöfer ein Targeting-Konstrukt hergestellt und dieses mittels Elektroporation in embryonalen Stammzellen kloniert. Da dies durch homologe Rekombination geschah, war der Genloкус festgelegt und die Zellkolonien konnten daraufhin selektiert werden. (Holthöfer, 2007) Homozygote Tiere dieser Linie wurden mit Tieren einer zweiten Linie verpaart, die Träger eines gewebespezifischen induzierbaren Cre-Rekombinase-Systems sind (Abbildung 6). Das Enzym Cre-Rekombinase wurde mit zwei Hormon-Bindungs-Domänen (HBD) des murinen Östrogenrezeptors fusioniert (Zhang *et al.*, 1995; (Sohal et al., 2001). Die Mer-Sequenzen werden an den C- und N-Termini der Cre-Rekombinase geknüpft, ohne deren enzymatische Aktivität negativ zu beeinflussen (Sohal et al., 2001). Die Hormon-Bindungs-Domänen des Östrogenrezeptors sind durch einen Tausch von Glyzin zu Arginin an der Position 525 mutiert, sodass sie kein endogenes 17 β -Östradiol mehr binden und allein durch Gabe des synthetischen 4-Hydroxy-Tamoxifen gesteuert werden (Zhang *et al.*, 1995). Eine gewebespezifische Aktivität wird nun durch Einfügen der Rekombinasen-cDNA in einen genetischen Lokus erreicht, bei dem eine spezifische Gewebeexpression bekannt ist. Zum Beispiel kann die cDNA der Cre-Rekombinase, die mit zwei Mer-Sequenzen fusioniert ist, in

einem herzspezifischen α -MHC-Promotor-Konstrukt subkloniert werden, um eine herzspezifische Rekombination zu erreichen (Sohal et al., 2001). Das komplette Fusionsprotein bindet in Abwesenheit des Liganden Tamoxifen im Zytoplasma an die Mer-Domäne des hsp90-Hitzeschockproteins, wodurch der Transport in den Zellkern blockiert wird. Erst wenn der spezifische Ligand Tamoxifen an die Mer-Domäne bindet, löst sich der Komplex von dem Hitzeschockprotein und wandert in den Kern. Dort bildet die Cre-Rekombinase den Rekombinationskomplex und schneidet, den von den loxP-Stellen flankierten Bereich (Exon 4-6) des Desmoglein 2-Gens heraus. Die Nachkommen dieser Verpaarung tragen homozygot das induzierbare DSG2^{loxP}-Allel und homozygot die induzierbare Cre-Rekombinase (MerCreMer) unter der Kontrolle eines herzmuskelspezifischen Promotors (α -MHC). Nach erfolgter mehrtägiger Applikation des Liganden Tamoxifen kommt es zu einer erfolgreichen Rekombination des Desmoglein 2-Gens. Diesem DSG2-Gen fehlen nun die Exone 4, 5 und 6, sodass Exon 3 an Exon 7 gespleißt wird. Es wird ein mutiertes Desmoglein 2-Protein gebildet (Abbildung 6). Es fehlen sämtliche Aminosäuren, die für die Bildung der hydrophoben Bindetasche verantwortlich sind. Weiterhin fehlen die Aminosäurereste, die für die *cis*-Interaktion der Cadherindomänen von Bedeutung sind. Des Weiteren fehlt eine Ca²⁺-Bindestelle, sodass eventuell mit einer Veränderung der Struktur und Konformation des Proteins gerechnet werden muss. Insgesamt könnte es durch die Verkürzung des extrazellulären Anteils (EC1 und 2) des Dsg2-Proteins zu einer Minderung der Kraftübertragung und Flexibilität, bis hin zu einem vollständigen Verlust der adhäsiven Eigenschaften des Proteins kommen. (Holthöfer, 2007).

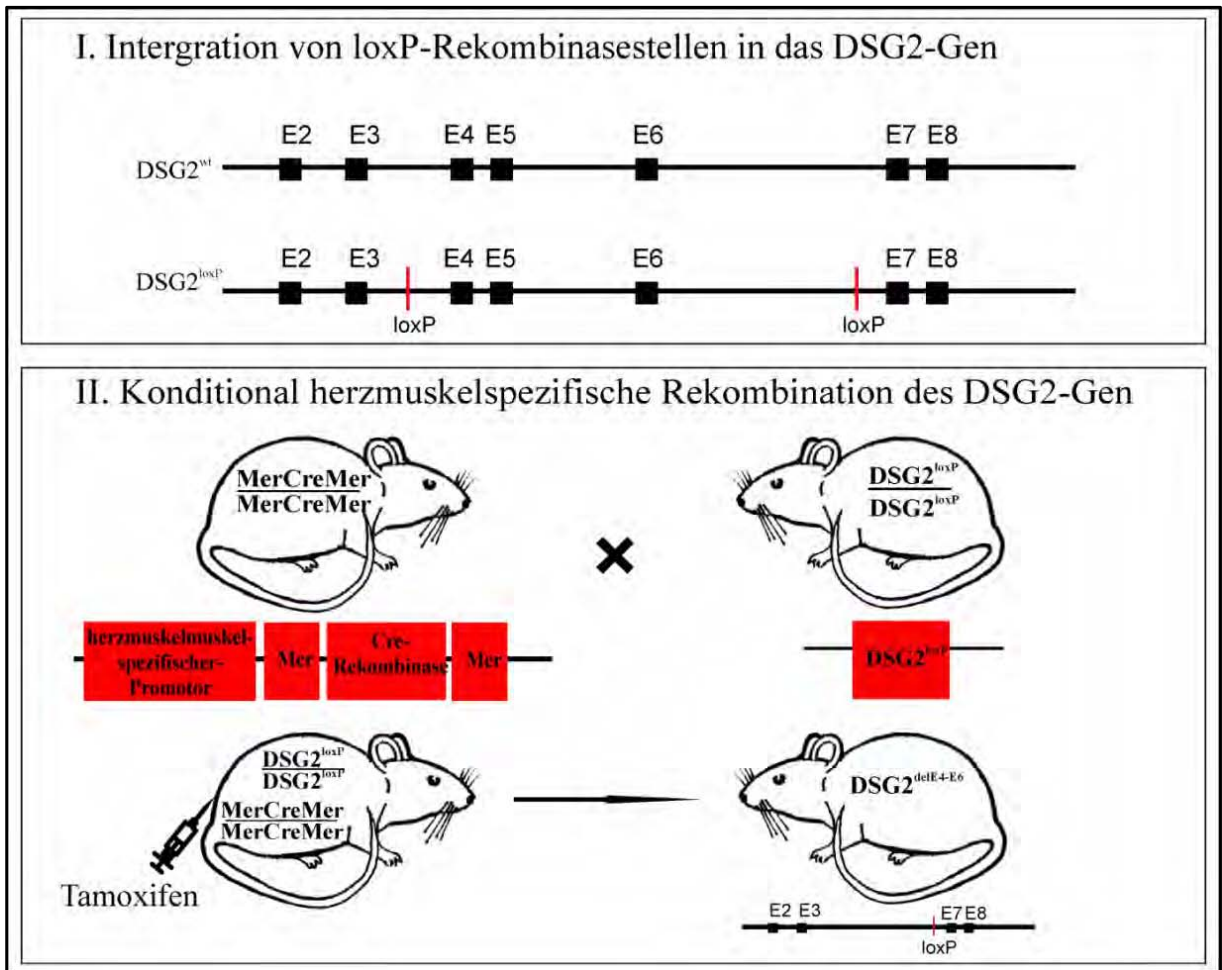


Abbildung 5: Konditional gewebespezifisches DSG2-Rekombinationssystem in der Maus:
I. Integration von loxP-Rekombinasestellen in das Desmoglein2-Gen mittels homologer Rekombination (Exone 4-6 flankierend) **II.** Verpaarung der homozygoten $DSG2^{loxP}$ -Mäusen mit Mäusen, die das MerCreMer-Rekombinationssystem unter der Kontrolle eines herzmuskelspezifischen Promotors tragen

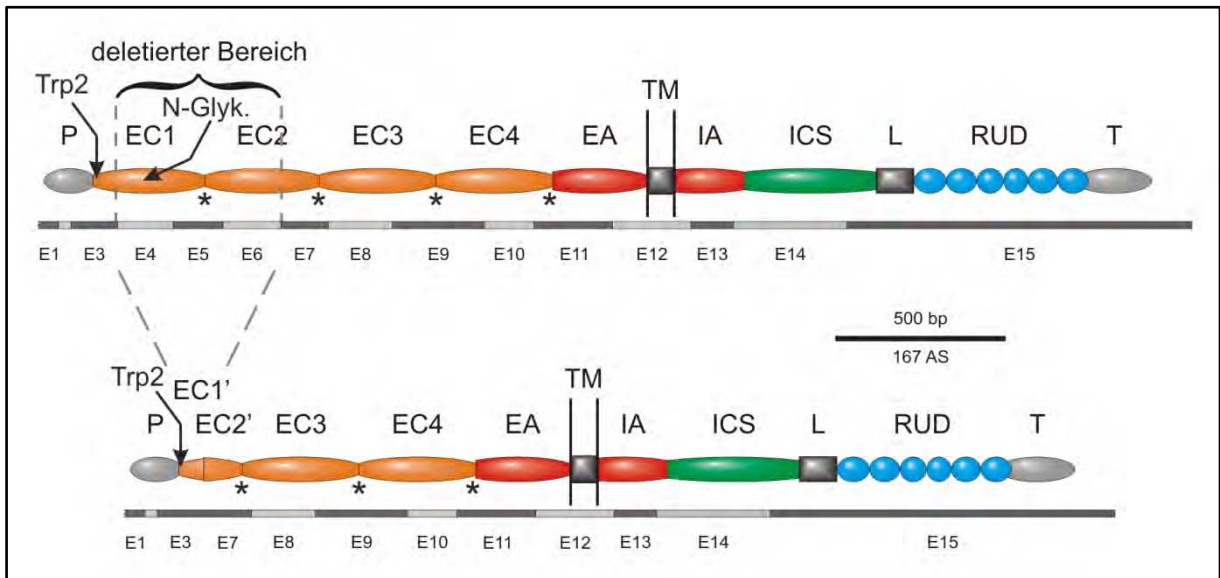


Abbildung 6: Deletion wichtiger Proteinbereiche von Dsg2 – vergleichende schematische Darstellung der DSG2-mRNA und der resultierenden Dsg2-Domänenstruktur des wildtypischen und rekombinierten Moleküls: es fehlen die Aminosäure-Reste für die hydrophobe Bindetasche, eine Ca^{2+} -Bindestelle und die Haupt-N-Glykolisierungsstelle; insgesamt wird der extrazelluläre Anteil des Dsg2-Proteins enorm verkürzt; P: Prodomäne; EC1-EC4: extrazelluläre Cadherindomänen; EC1' und EC2': Fragmente der betroffenen extrazellulären Domänen nach erfolgter Rekombination; EA: extrazelluläre Ankerdomäne; TM: Transmembrandomäne; IA: intrazelluläre Ankerdomäne; ICS: intrazelluläres cadherinartiges Segment; LD: Linkerdomäne; RUD: „repeated unit domain“; T: terminale Domäne; Trp2: Aminosäure 2 des reifen Proteins (Tryptophan); *: Ca^{2+} -Bindestellen; N-Glyk: N-Glykolisierungsstelle; E1-E15: Exone (Holthöfer, 2007)

1.11. Ziele

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des desmosomalen Cadherins Dsg2 für die mechanische Kopplung und funktionelle Integrität von Kardiomyozyten hinsichtlich der Erkrankung ARVC zu klären und ein geeignetes Tiermodell zur Erforschung dieser Erkrankung zu etablieren.

Um die Auswirkungen der DSG2-Mutation über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, sollte zusätzlich zu dem ersten transgenen konditionalen *Knockout* ein konstitutiver *Knockout* generiert werden, in welchem die Cre-Rekombinase-Expression unter der Kontrolle eines β -Actin-Promotors gesteuert wird. Der konditionale *Knockout* sollte hinsichtlich seiner Induzierbarkeit optimiert werden, um auch über unterschiedliche Induktionszeiträume zuverlässige Ergebnisse zu zeigen.

Da die Möglichkeit bestand, dass die transgenen Tiere durch die Mutation des DSG2-Gens eine eingeschränkte Herzleistung besitzen, sollten die beide Tierstämme regelmäßig klinisch untersucht werden, um Auffälligkeiten im Verhalten und im Gesundheitszustand zu kontrollieren. Für die Erkrankung ARVC ist der Ersatz des Herzmuskelgewebes durch

Bindegewebe charakteristisch. Um Parallelen zur Erkrankung ARVC zu ziehen, sollten verendete oder getötete Tieren obduziert werden und auf ähnliche makroskopische Veränderungen im Herzen untersucht werden. Proben dieser Herzen sollten mit verschiedenen Färbemethoden histologisch untersucht werden, um die Anordnung der Herzmuskelzellen zu vergleichen und um Mikrorupturen, nekrotische/apoptotische Zellen und bindegewebigen Ersatz zu identifizieren. Da in anderen Tiermodellen zur Untersuchung von ARVC bereits ultrastrukturelle Veränderungen der Glanzstreifen gefunden wurden, sollten hier ultrastrukturelle Veränderungen der Zellkontakte und des kontraktilen Apparats, mittels Elektronenmikroskopie untersucht und identifiziert werden.

Da das mutierte Protein Desmoglein 2 im Herzmuskel exklusiv exprimiert wird, sind in den transgenen Tieren Veränderungen in der Konzentrierung und der Verteilung der Interaktionspartner Plakoglobin, Plakophilin 2 und Desmoplakin zu erwarten. Weiterhin können sich die Verteilung und die Konzentrierung der Proteine der anderen Adhärenzverbindungen verändern. Um dies zu untersuchen sollten immunhistologische Methoden angewandt werden, mit Antikörpern gegen Desmoglein 2, Desmoplakin, Plakoglobin, Plakophilin 2, N-Cadherin und β -Catenin. Es können sich Unterschiede in der Proteinmenge, Fehl-/Umverteilungen und ungewöhnlichen Protein-Ansammlungen zeigen, wie es z.B. bei Plakophilin 2-*Knockout*-Mutanten beobachtet wurde (Grossmann et al., 2004). Zum Schluss sollten Untersuchungen hinsichtlich der Pathogenese der Erkrankung ARVC vorgenommen werden. Dabei sollte geklärt werden, ob den desmosomalen Proteinen eine Beteiligung in der Regulierung von Signalwegen zukommt (siehe Kapitel 1.5.4.) und somit die Entstehung der Erkrankung nicht alleine durch den Verlust der adhäsiven Eigenschaften begünstigt wird. Um herauszufinden, ob es zu einer Beteiligung der Signalwege kommt, sollten Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen die Zielgene der Signalwege durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Gefäße

Tabelle 1: Geräte/Materialien

Gerät	Bezugsquelle
Adhesive PCR Film	ABgene, Hamburg
Adhesive PCR Foil Seals	ABgene, Hamburg
Alufolie	VWR, Darmstadt
Autoklav Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Blotkammer Transblot SD (Semi-Dry)	BioRad, München
Biofuge <i>pica</i>	Heraeus, Hanau
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus, Hanau
Röntgenfilm BioMax Light-1, 18x24	Kodak, Rochester, New York
Deckgläser (24x60 mm)	Menzel-Glaser, Braunschweig
Digitalkamera EXILIM 5 Megapixel	Casio, Norderstedt
Eismaschine AF-10	Scotsman, Mailand
Elektronenmikroskop Leo 906E	Zeiss, Jena
Entwickler LX-24, Fixierer	Kodak, Rochester, New York
Fluoreszenzmikroskop IX-70	Olympus, Hamburg
Geldokumentation-Image Master VDS	GE Healthcare (Pharmacia), München
Homogenisator (Glas)	Hartenstein, Würzburg
Kamera Olympus IMAGO	Till Photonics, München
Kryostat (2800 Frigocut)	Reichert-Jung
Laser Scanning Mikroskop (TCS SP5)	Leica, Wetzlar
Liquid Blocker Super Pap-Pen	Science Services
Megafuge 1,0 R	Heraeus, Hanau
Micro-Fine TM + Demi Insulin Spritzen	BD, Heidelberg
Mikroküvetten	Ratiolab, Dreieich
Mikroskop Nikon Edipse E 200	Nikon, Düsseldorf
Nitrozellulose Optitran BA-S83	Whatman (Schleicher & Schuell), Dassel

Ohrmarken und Ohrmarkenzange	Hauptner & Herberholz, Solingen
PAGE-System Mini Protean II/III	BioRad, München
Parafilm „M“	Sigma-Aldrich, München
Pasteurpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Roth, Karlsruhe
PCR-Gerät Advanced Primus 96	Peq Lab, Erlangen
PCR-Gerät Advanced Primus 96	MWG Biotech, Martinsried
PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
pH-Meter	VWR, Darmstadt
Photometer Ultraspec 2000 UV	GE Healthcare (Pharmacia), München
Plastikpipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Plastikpipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
Plastikpipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht
Scanner Perfection 1670	Epson, Meebusch
Super Frost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Ultraschallgerät Branson Sonfier 250	Branson, Dietzenbach
Whatman-Papier CB002 Gel Blotting Papier	Whatman (Schleicher & Schuell), Dassel

2.1.2. Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton mind. 99,5%	Roth, Karlsruhe
AFA (HISTONORM®)	VWR, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hessisch Olendorf
AgNO ₃	Merck, Darmstadt
Anilin	Chroma, Münster
Anilinblau	Merck, Darmstadt
Azokarmin G	Chroma, Münster
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma-Aldrich, München
Butanol-(1)	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau-G250	Serva, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Di-Kaliumhydrogenphosphat [K ₂ HPO ₄]	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat [Na ₂ HPO ₄]	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eosin	Chroma, Münster
Epoxy Resin (EPON 812)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid 1 %	Roth, Karlsruhe
4 % Formalin	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Chroma, Münster
Isopentan (2-Methylbutane)	Fluka Chemie AG, Seelze
Isopropanol mind. 99,5 %	Roth, Karlsruhe

MgCl ₂	VWR, Darmstadt
B-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylbenzoat	Merck, Darmstadt
Methylgrün Zinkchlorid	Merck, Darmstadt
Milchpulver (Naturaflor)	Töpfer, Dietmannsried
Mowiol	Sigma-Aldrich, München
NDS (Normal Donkey Serum)	Jackson ImmunoResearch, Suffolk
Natriumchlorid (5 M NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natronlauge [NaOH]	Roth, Karlsruhe
NH ₃	Merck, Darmstadt
Orange G	Chroma, Münster
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Paraffin	Medite, Burgdorf
PMSF	Merck, Darmstadt
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, München
Rotiphoese, NF-Acrylamid/Bis-Lösung	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 1 mol/L	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Stickstoff	Linde, Wiesbaden
Sucrose	Sigma-Aldrich, München
Tamoxifen 99%	Sigma-Aldrich, München
Taq-Puffer	VWR, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-Pufferan®	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Merck, Darmstadt
Uranylacetat	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30 %)	Merck, Darmstadt
Wolframatphosphorsäure Hydrat	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

2.1.3. Enzyme und Reagenziensätze (Kits)

Tabelle 3: Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
<i>Taq-Polymerase</i>	VWR, Darmstadt
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München
T4-DNA-Ligase	MP BIOgene, Solon US
REVERSE-IT™ RTASE BLEND	ABgene, Hamburg

Tabelle 4: Kits

Kit	Bezugsquelle
<i>DNeasy™ Blood and Tissue Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Enhanced Avian Reverse Transcriptase-PCR Kit</i>	Sigma-Aldrich, München
<i>RNase free DNase-Set</i>	Qiagen, Hilden
<i>ApopTag™ Peroxydase ISOL Kit</i>	MP BIOgene, Solon, US

2.1.4. Antikörper

Tabelle 5: Primärantikörper

Antigen	Bezugsquelle	Spezies	IF (Verdünnung)	WB (Verdünnung)
Desmoglein 2	Bastian Holthöfer, Mainz	Kaninchen	1:400	1:1000
Plakophilin 2	Prof. Franke, Heidelberg	Maus	unverdünnt	1:1000
Plakoglobin	Prof. Franke, Heidelberg	Maus	unverünnt	1:100
Desmoplakin	Prof. Franke Heidelberg	Meerschweinchen	1:500	-
β-Catenin	BD, Heidelberg	Maus	1:50	1:500
N-Cadherin	BD, Heidelberg	Maus	1:250	-
Connexin 43	Zymed, München	Maus	1:25	-
c-Myc	Santa Cruz, Heidelberg	Maus	-	1:200
Cyclin D1	Santa Cruz, Heidelberg	Maus	-	1:200
Vimentin	Dr. Hoffmann, Heidelberg	Meerschweinchen	1:100	-
p38	Cell Signaling, Boston, US	Maus	-	1:1000
Aktin	Sigma-Aldrich, München	Maus	-	1:200

Tabelle 6: Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Spezies	IF (Verdünnung)	WB (Verdünnung)
Cy2- α -Maus-IgG	Rockland/Biotrend	Ziege	1:50	-
Cy2- α -Meerschweinchen-IgG	Jackson/Dianova	Ziege	1:100	-
Cy3- α -Kaninchen-IgG	Rockland/Biotrend	Esel	1:500	-
Peroxidase-konjugierter- α -Maus-IgG (50 % Glycerol)	Jackson/Dianova	Ziege	-	1:7000
Peroxidase-konjugierter- α -Kaninchen-IgG (50 % Glycerol)	Jackson/Dianova	Ziege	-	1:7000

2.1.5. Puffer für molekularbiologische Arbeiten

Tabelle 7: Lysepuffer Mäuseschwänze

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Tris-HCl	50 mM	5 ml Tris-HCl (1 M, pH 7,4)
EDTA	100 mM	20 ml EDTA (0,5 M)
NaCl	100 mM	2 ml NaCl (5 M)
SDS	1 % (w/v)	10 ml SDS (10 % w/v)
H ₂ O		ad 100 ml
Vor der Anwendung wurden 0,5 mg/ml Proteinase K hinzugefügt		

Tabelle 8: 10 x DNA-Probenpuffer

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Glyzerin	30 % (v/v)	30 ml Glyzerin
SDS	1 % (w/v)	10 ml SDS (10 %)
EDTA	50 mM	10 ml EDTA (0,5 M)
Tris-HCl	10 mM	1 ml Tris-HCl (1 M)
Bromphenolblau		Spatelspitze
Xylencyanol		Spatelspitze
H ₂ O		ad 100 ml

2.1.6. Puffer für die Proteinbiochemie

Tabelle 9: 10 x PBS

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
NaCl	137 mM	8 g NaCl
KCl	3 mM	0,22 g KCl
K ₂ HPO ₄	2 mM	0,35 g K ₂ HPO ₄
Na ₂ HPO ₄	8 mM	1,15 g Na ₂ HPO ₄
H ₂ O	pH 7,4	ad 1 Liter

Tabelle 10: Protein-Lysepuffer 1

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Tris-HCl	50 mM	5 ml Tris-HCl (1 M, pH 7,4)
NaCl	150 mM	3 ml NaCl (5 M)
EDTA	5 mM	1 ml EDTA (0,5 M)
Triton X-100	1 % (v/v)	1 ml Triton X-100
PMSF	0,5 %	50 mg PMSF
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 11: Protein-Lysepuffer 2

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Tris-HCl	50 mM	5 ml Tris-HCl (1M)
PMSF	0,5 %	50 mg PMSF
SDS	2 % (w/v)	20 ml SDS (10 % w/v)
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 12: 10 x Elektrodenpuffer

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Tris-Base	250 mM	30 g Tris-Base
Glyzin	520 mM	144 g Glyzin
SDS	1 % (w/v)	10 g SDS
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 13: SDS-Trenngel (10 %)

Stoff	Konzentration	Menge für 15 ml (2Gele)
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung (30 %)	10 % (v/v)	5 ml Rotiphorese
Tris-Puffer	250 mM	3,8 ml Tris-Puffer (1,5 M, pH 8,8)
SDS	1 % (w/v)	150 µl SDS (10 % w/v)
APS	1 % (w/v)	150 µl APS (10 % w/v)
TEMED		6 µl
H ₂ O		ad 15 ml

Tabelle 14: SDS-Sammelgel (5 %)

Stoff	Konzentration	Menge für 6 ml (2Gele)
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung (30 %)	5 % (v/v)	1 ml Rotiphorese
Tris-Puffer	120 mM	0,75 ml Tris-Puffer (1,5 M, pH 8,8)
SDS	1 % (w/v)	60 µl SDS (10 % w/v)
APS	1 % (w/v)	60 µl APS (10 % w/v)
TEMED		6 µl
H ₂ O		ad 6 ml

Tabelle 15: Coomassie-Färbelösung

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Coomassie-Brilliant-Blau G250	2,5 % (w/v)	250 mg Coomassie-Brilliant-Blau G250
Ethanol	50 % (v/v)	50 ml Ethanol
Essigsäure	10 % (v/v)	10 ml Essigsäure
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 16: Coomassie-Entfärbelösung

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Ethanol	30 % (v/v)	300 ml Ethanol
Essigsäure	10 % (v/v)	100 ml Essigsäure
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 17: Silberfärbelösung

Herstellung Färbelösung (100 ml)
Lösung A: 0,8 g AgNO ₃ in 4 ml H ₂ O lösen
Lösung B: 2,1 ml NaOH (1M) + 1,6 ml NH ₃
Lösung A unter Schwenken zu Lösung B geben und mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen

Tabelle 18: Silberentwicklerlösung

Herstellung Entwicklerlösung (250 ml)
250 mg Zitronensäure in 250 ml H ₂ O lösen
+ 0,8 ml Formaldehydlösung (37% w/v))

Tabelle 19: Silberstopperlösung

Herstellung Stopperlösung (100 ml)
50 ml Ethanol + 5 ml Eisessig + H ₂ O ad 100 ml

Tabelle 20: Ponceau-Färbelösung

Stoff	Konzentration	Menge für 500 ml
Ponceau-S	2 % (w/v)	10 g Ponceau-S
Trichloressigsäure	30 % (w/v)	150 g Trichloressigsäure
Sulfosalizylsäure	30 % (w/v)	150 g Sulfosalizylsäure
H ₂ O		ad 500 ml

Tabelle 21: 10 x TBS

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Tris-Base	0,2 M	24,2 g
NaCl	1,3 M	80 g
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 22: TBST

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
TBS	1x	100 ml TBS (10x)
Tween-20	0,1 % (v/v)	1 ml Tween-20
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 23: Transferpuffer

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Tris-Base	25 mM	3 g Tris-Base
Glyzin	192 mM	14,4 g Glyzin
Methanol	10 % (v/v)	100 ml
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 24: Stripping-Puffer

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
SDS	2 % (w/v)	20 g SDS
Tris-Base	62,5 mM	7,6 g Tris-Bae
H ₂ O		ad 1 Liter
Vor der Anwendung wurden 350 µl β-Mercaptoethanol zum Puffer hinzugefügt.		

2.1.7. Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

Tabelle 25: Zitratpuffer

Herstellung des Zitratpuffers für die Antigendemaskierung
Lösung A: 0,1 M Zitronensäure (21,01 g Zitronensäure x H ₂ O + H ₂ O ad 1 Liter)
Lösung B: 0,1 M Natriumzitat (29,41 g Trinatriumzitat x 2 H ₂ O + H ₂ O ad 1 Liter)
1,4 ml Lösung A + 8,6 ml Lösung B, H ₂ O ad 100 ml

Tabelle 26: Elvanol

Herstellung des Elvanols
1 g Mowiol 4-88 in 4 ml 1 x PBS (pH 8,0) unter Rühren (16 Stunden) lösen
2 ml Glycerin hinzugeben
15 Minuten zentrifugieren, den Überstand abnehmen und Lösung aliquotieren.

2.1.8. Ansätze der Färbelösungen

Tabelle 27: Azokarminlösung

Herstellung Azokarminlösung
0,1 g Azokarmin G wurden in 100 ml H ₂ O aufgeschwemmt
Nach kurzem Aufkochen wurde das Gemisch abfiltriert.
Zu 100 ml 1 ml Eisessig hinzufügen.

Tabelle 28: Anilinblau-Orange-Gemisch

Herstellung Anilinblau-Orange-Gemisch
0,5 g Anilinblau und 2 g Orange G wurden in 100 ml H ₂ O gelöst
+ 8 ml Eisessig
Nach kurzem Aufkochen wurde die Färbelösung filtriert.

Tabelle 29: Anilinalkohol

Herstellung Anilinalkohol
100 ml Ethanol (90%) + 0,1 ml Anilin

Tabelle 30: essigsaurer Alkohol

Herstellung essigsaurer Alkohol
100 ml Ethanol (96 %) + 1 ml Eisessig

2.1.9. Lösungen für die Elektronenmikroskopie

Tabelle 31: Karnovsky-Lösung

Stoff	Konzentration
Formaldehyd	3 %
Glutaraldehyd	2,5 %
PBS	Ad 100 ml

Tabelle 32: Reynoldsche Bleizitratlösung

Stoff	Konzentration
Bleinitrat	26,6 g/l
Natriumzitrat	35,2 g/l
Natriumhydroxid	16 %

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Präparation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Die frischen Schwanzspitzen (2-4 mm) wurden über Nacht bei 55°C mit 750 µl Lysepuffer (Tabelle 7) und 15 IE Proteinase K inkubiert. Die Proteinase K führt zum proteolytischen Abbau der Zellproteine. Am nächsten Tag wurden die lysierten Proben mit 250 µl 5 M NaCl-Lösung versetzt und die Zelltrümmer durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 13.0000 g sedimentiert. Daraufhin wurden 750 µl des Überstandes in neue Eppendorfgläser überführt und mit 600 µl Isopropanol gefällt. Die Nukleinsäuren wurden erneut durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 13.0000 g sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das Sediment wurde mit 150 µl 75%-igem Ethanol versetzt und wieder bei 13.0000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das DNA-Präzipitat wurde in 50 µl H₂O_{a.i.} gelöst. Um den Lösungsvorgang zu unterstützen, wurden die Proben mit geöffnetem Deckel für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach mehreren Tagen bei 4°C konnten die Proben für PCR-Untersuchungen genutzt werden.

2.2.1.2. Präparation genomischer DNA aus Geweben (außer Schwanzbiopsien)

Die DNA aus Gewebeproben (insbesondere Herz) wurde mit Hilfe des *DNeasy® Tissue Kits* aufgeschlossen. Die Puffer ATL, AL, AW1 und AW2 wurden als fertige Lösungen im Kit mitgeliefert. Die entnommenen Proben wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert, falls die Weiterverarbeitung nicht direkt im Anschluss stattfand. Die DNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers durch Zugabe von Proteinase K, Bindung hochmolekularer DNA an die Silikamembran der Säulen unter Hochsalzbedingungen in hydrophobem Milieu und schließlich Elution der DNA unter Nierdrigsalzbedingungen.

Die Proben wurden mit 180 µl ATL-Puffer und 40 µl Proteinase K für drei Stunden bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl AL-Puffer und 200 µl 100%-igem Ethanol versetzt und gevortext. Der Mix wurde in eine *DNeasy Mini spin Säule* pipettiert und bei 8.000 g für eine Minute zentrifugiert. Der obere Teil des *DNeasy Mini spin Säule* wurde in ein neues Sammelgefäß gestellt und 500 µl AW1-Puffer je Probe hinzugefügt und wiederum bei 8.000 g für eine Minute zentrifugiert. Der obere Teil wurde in ein neues Sammelgefäß gestellt und 500 µl AW2-Puffer je Probe hinzupipettiert. Die Proben wurden bei 13.000 g für

drei Minuten zentrifugiert, um jegliches Ethanol zu entfernen. Der obere Teil wurde anschließend in ein Eppendorfgefäß gestellt und 200 µl AE-Puffer hinzugegeben. Nach einer Minute Wartezeit wurden die Proben bei 8.000 Umdrehungen für eine Minute zentrifugiert. Die DNA in den Eppendorfgefäßen konnte anschließend direkt bearbeitet werden.

2.2.1.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben

Die RNA-Isolierung aus Geweben (hauptsächlich Herzgewebe) wurde mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kits* und des *RNase-Free DNase-Sets* durchgeführt. Die Puffer RW1, RDD und RPE wurden als fertige Lösungen im Kit mitgeliefert. Um eine Verunreinigung der Gefäße mit RNase vor der Nutzung weitestgehend auszuschließen, wurden diese vorher für eine Stunde in 1%-iger Natronlauge eingelegt und anschließend für eine Stunde in DEPC-Wasser gereinigt und im Trockenschrank bei 200°C getrocknet.

Um eine optimale Ausbeute zu erlangen, wurde ein Verdau-Schritt mit Proteinase K integriert. Die Proben (10-30 mg) wurden mit 300 µl RLT-Puffer (Guanidinisothiocyanathaltiger Lysepuffer), 3 µl β-Mercaptoethanol, 590 µl doppelt destilliertem Wasser und 10 µl Proteinase K homogenisiert und für 15 Minuten bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 9.000 g für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand (900 µl) in ein neues Gefäß überführt. Es wurde 600 µl 75%-iges Ethanol durch Auf-und Abpipettieren hinzugefügt. Durch das Ethanol bindet die RNA an die *RNeasy Silicagel-Membran*. 700 µl dieses Gemischs wurden auf eine *RNeasy Mini spin Säule* aufgetragen und 15 Sekunden bei 1000 g zentrifugiert. Der obere Teil wurde auf ein neues Sammelgefäß gestellt und 350 µl RW1-Puffer aufgetragen. Die Proben wurden erneut bei 1000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen wurde ein Zwischenschritt eingeschaltet. 80 µl eines DNase-Inkubationsansatzes (bestehend aus 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer) wurden auf die Proben aufgetragen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden erneut 350 µl RW1-Puffer zu den Proben gegeben und diese bei 1000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Die Säulen wurden auf ein neues Sammelgefäß gestellt und 500 µl RPE-Puffer hinzupipettiert und bei 1000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt und daraufhin wurden die Proben auf ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gestellt und 50 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und ein letztes Mal bei 1000 für 1 Minute zentrifugiert. Die RNA wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

2.2.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR lassen sich bestimmte DNA-Fragmente (Matritze) amplifizieren. Dabei wird ein Bereich vervielfältigt, der von zwei komplementären Oligonukleotiden (Primer) flankiert wird. Zu Beginn des Zyklus wird die doppelsträngige DNA aufgeschlossen (Denaturierung). Dies geschieht über eine anhaltende Erhitzung bei ca. 94-96°C, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden und am Ende nur noch zwei Einzelstränge vorliegen. Anschließend wird über eine Temperaturänderung, die sich an der Länge und Sequenz der verwendeten Primern orientiert, dessen Anlagerung (Annealing) an die richtigen Sequenzen der DNA-Einzelsträngen erreicht. Als Nächstes folgt die DNA-Polymerisierung (Elongation) durch die Polymerase unter Verwendung der zugefügten dNTP's. Die Polymerase füllt die fehlenden Stränge mit den freien Nukleotiden auf. Auch hier hängt das Arbeitsoptimum der Polymerase von einer bestimmten Temperatur ab. In jedem Zyklus stehen dadurch doppelt so viele Matritzen zur Verfügung, sodass sich die Produkte exponentiell vermehren.

Die PCR-Reaktionen wurden mit der Taq-DNA-Polymerase durchgeführt und die verwendeten Primer waren ca. 20 Nukleotide lang. Ihre entsprechende Annealing-Temperatur wurde nach der Formel $T[°C] = 2(A+T) + 4(C + G)$ berechnet.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten	1
Denaturierung	94°C	45 Sekunden	30
Anlagerung	58°C	45 Sekunden	30
Polymerisierung	72°C	45 Sekunden	30
Finale Polymerisierung	72°C	5 Minuten	1

Tabelle 33: Beispiel für ein PCR-Programm mit Taq-Polymerase

Standard-PCR-Ansatz
Bis zu 500 ng genomische DNA
2,5 µl 10x Reaktionspuffer
0,25 µl 10 mM dNTP-Mix
2,5 µl Vorwärts-Oligonukleotide
2,5 µl Rückwärts-Oligonukleotide
0,1 µl Taq-DNA-Polymerase
H ₂ O _{a.i.} ad 25 µl

Tabelle 34: Pipettierschema für eine PCR mit einer Taq-Polymerase

Nach Ablauf einer Reaktion wurde der Ansatz mit jeweils 5 µl 6x DNA-Ladepuffer versetzt und 10 µl davon auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.1.5. Gelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatreste kann DNA im alkalischen Milieu, in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Nukleinsäuren wandern, in Abhängigkeit von ihrer Größe, von der Kathode zur Anode. Die Agarosekonzentration hat einen entscheidenden Einfluss auf das Auftrennungsvermögen des Gels. Es wurde ein Gel hergestellt, indem 1,8 g Agarose in 150 ml 1x TBE-Puffer durch Erwärmen in der Mikrowelle aufgelöst wurden. Nachdem das Gemisch auf 50°C abgekühlt war, wurde es mit 6 µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelelektrophoresekammer gegossen. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch UV-Licht angeregt wird. Durch die Interkalierung des Farbstoffes zwischen die Basen der Nukleinsäuren konnte die DNA nach Anregung durch UV-Licht als leuchtende Banden sichtbar gemacht werden.

Nach ungefähr 20 Minuten wurde das Gel fest und die mit 5 µl DNA-Ladepuffer versehenen Proben konnten neben einen entsprechenden Größenmarker in die Taschen des Gels pipettiert werden. Es wurde eine Spannung von 60-120 Volt angelegt, wodurch die DNA angeregt wurde, in Richtung Anode zu wandern und sich entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Im Anschluss konnten die DNA-Fragmente durch UV-Bestrahlung visualisiert und dokumentiert werden.

2.2.1.6. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wird angewendet, um die mRNA zu untersuchen. Dies geschieht mit dem Enzym reverse Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die die RNA in eine cDNA umschreibt. Diese cDNA wiederum kann in einer PCR-Reaktion spezifisch amplifiziert und untersucht werden. Die Reverse Transkriptase benötigt, wie die DNA-Polymerase, spezifische Primer, an die sie binden kann. Es wurden Oligo-d(T)-Primer verwendet, die aus mehreren Thymin-Basen bestehen und komplementär an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA binden.

Die Lösung aus RNA und Primern wurde für 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Anschließend wurden die restlichen Reagenzien (bestehend aus Puffer, DTT, dNTP-Mix, Reverse Transkriptase und H₂O) hinzugegeben und bei 48°C für 1 Stunde inkubiert. Abschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 75°C für 10 Minuten inaktiviert.

Die entstandene cDNA wurde anschließend in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert und elektrophoretisch aufgetrennt.

RT-PCR-Ansatz
0,5-1 µg Gesamt-RNA
1 µl oligo(dT)-Oligonukleotide
H ₂ O _{a.i.} ad 11 µl
Denaturierung der RNA bei 70°C für 5 Minuten
4 µl Puffer
1 µl DTT (100 mM)
0,1 µl dNTP-Mix (10 mM)
1 µl Reverse Transkriptase
20 µl H ₂ O _{a.i.}
Inkubation bei 48°C für 60 Minuten
Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 75°C für 10 Minuten

Tabelle 35: RT-PCR-Ansatz

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Gesamtproteinisolierung aus tierischen Geweben

Es wurde entweder direkt frisch gewonnenes Gewebe oder in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Herzgewebe benutzt, um Proteinextrakte herzustellen. Die Gewebestückchen wurden in einem Glashomogenisator mit jeweils 1 ml Protein-Lysepuffer 2 (Tabelle 11) bei 4°C (im Eis stehend) vollständig homogenisiert. Danach wurden die Proben bei 94°C für zehn Minuten inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Um die Proben vollständig zu homogenisieren, wurden sie bei 4°C mittels Ultraschall weiter aufgeschlossen. Im Anschluss wurden die Proben 30 Minuten auf Eis gekühlt und dann bei 4°C für 10 Minuten und 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration durch Proteinquantifizierung nach Bradford ermittelt.

2.2.2.2. Proteinquantifizierung nach Bradford

Das Farbstoffmolekül Coomassie-Brilliant Blau bindet im sauren Milieu an die hydrophoben Seitenketten der Proteine. Dadurch wird das Absorptionsmaximum nach 595 nm verschoben. Um eine genaue Messung zu erreichen, ist es wichtig, ein geeignetes Eichprotein auszuwählen. 20 µl der Proteinprobe wurden mit 1:5 verdünnten Bradford-Reagenz gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 595 nm photometrisch gemessen. Die Messung konnte unter Zuhilfenahme einer Eichgeraden genau bestimmt werden.

2.2.2.3. Immunoblot

In der Western Blot-Analyse werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen (*Blotting*) und anschließend über eine spezifische Antikörperfärbung nachgewiesen.

Vor dem eigentlichen „*Blotten*“ werden die Proteine in einem Polyacrylamid-Gel entsprechend ihrer Ladung und Größe aufgetrennt. Dafür bedient man sich der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Das anionische Detergenz SDS (*Sodium-DodecylSulfate*) maskiert die Eigenladung der Proteine, die dadurch mit konstanter negativer Ladung durch die Acrylamid-Matrix zur Anode wandern können. Weiterhin werden die Proteine zuvor denaturiert, sodass sie entsprechend ihrer Molmasse unterschiedlich weit im Gel wandern. Es entstehen so scharf

abgegrenzte Proteinbanden. In diesem Fall wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Laemmli-Methode (1970) durchgeführt. Die Proteine durchlaufen zuerst ein großporiges Sammelgel (pH 6,8). Sie werden an der Grenzschicht zum Trenngel durch die Klammerwirkung des Glyzins konzentriert und laufen als scharfe Banden in das Trenngel (pH 8,8) ein. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit SDS-Probenpuffer versetzt (1:2 verdünnt), 5 Minuten zur Proteindenaturierung bei 94 °C inkubiert, anschließend auf Eis gekühlt und in die Taschen gefüllt. Für die Elektrophorese wurde erst eine Spannung von 80 V angelegt, die nach Einlaufen in das Trenngel auf 120 V erhöht wurde. Um das Proteingewicht der Proben abschätzen zu können, wurde ein Proteinmarker parallel mitlaufen gelassen.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Proben mittels Elektrotransfer in einem halbtrockenen („*semi-dry*“) Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (*Blotting*). Dabei wurde senkrecht zum Polyacrylamidgel ein elektrisches Feld aufgebaut, wodurch die Proteine veranlasst wurden von dem Gel auf die Membran zu wandern. Die Proteine bleiben aufgrund ihrer hydrophoben Wechselwirkungen an der Oberfläche der Membran haften und können dort durch Auswaschen des gebundenen SDS renaturieren. Nach diesem Vorgang sind die Proteinbanden zugänglich für verschiedene spezifische Nachweismethoden, zB. für Antikörper. Dazu wurden das Gel und die Nitrozellulosemembran nach der SDS-PAGE kurz in Transfer-Puffer eingeweicht. Zwei Lagen in Transfer-Puffer getränktes Whatman-3MM-Papier wurden auf einer Platinelektrode der Transfereinheit platziert, darauf wurde luftblasenfrei die Nitrozellulosemembran und das Gel platziert und zum Schluss wieder drei in Transfer-Puffer getränkte Whatmann-3-MM-Papierstücke daraufgelegt. Die Amperezahl für den Transfer wurde nach der Formel: Größe des Gels x 1,5 berechnet und lag in diesem Fall bei 68 mA und dauerte ca. 2 Stunden.

Nach dem „*Blotten*“ wurde die Effizienz des Transfers überprüft, indem die Membran mit dem Farbstoff Ponceau-S angefärbt wurde. Durch diesen Farbstoff werden die Proteinbanden auf der Membran sichtbar. Die Nitrozellulosemembran wurde dafür 5-10 Minuten im Farbstoff Ponceau-S inkubiert und anschließend in 1xTBS gewaschen.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde in Milchpulver eingelegt, um unspezifische Bindungsstellen der Proteine zu *blocken*. Dafür wurden 5 g Milchpulver in 100 ml 1xTBS gelöst. Daraufhin wurde die Membran über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung mit dem Primärantikörper für das zu detektierende Protein inkubiert. Der Primärantikörper wurde vorher entsprechend mit BSA und 1xTBS auf seine Endkonzentration

verdünnt. Nach der Erstinkubation wurde die Membran dreimal in 1xTBS gewaschen und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in ständiger Bewegung mit dem Zweitantikörper inkubiert. Der Zweitantikörper erkennt den F_c-Teil des Primärantikörpers und hat eine Meerrettich-Peroxidase gebunden, die unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von H₂O₂ die Oxidation von Luminol katalysiert. Durch diese Reaktion konnte eine Lumineszenz detektiert werden, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnte. Der Sekundärantikörper wurde vor der Inkubation mit 1xTBST und 5% Milchpulver verdünnt.

Nach den 1,5 Stunden Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Nitrozellulosemembran zweimal 5 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und zur Sichtbarmachung in die Fotokammer gelegt. Das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol wird durch die Peroxidase katalysiert und löste so eine Chemilumineszenz aus. Im Fotolabor wurde die Membran auf Fotopapier gepresst und durch Entwickler sichtbar gemacht.

Es gibt die Möglichkeit eine mit Proteinbanden besetzte Nitrozellulosemembran erneut mit einem anderen Antikörper zu inkubieren. Dafür musste der vorherig benutzte Antikörper abgewaschen werden. Dieser Vorgang wird als *Strippen* bezeichnet. Die Membran wurde für 30 Minuten bei 55°C im Schüttelbad in 50 ml Stripping-Puffer gewaschen und anschließend solange in H₂O gewaschen bis kein β-Mercaptoethanol mehr nachweisbar war.

2.2.3. Immunhistologie

2.2.3.1. AFA-Fixierung

Die frisch entnommenen Herzstückchen wurden für 2 Stunden in AFA (Ethanol, Essigsäure, 2%iges Paraformaldehyd) eingelegt. Bei AFA handelt es sich um ein Fixativ, das zu einem geringen Anteil den Farbstoff Eosin enthält. Der Vorteil dieser Fixierung ist die deutlich verbesserte Gewebeerhaltung im Vergleich zu unfixiertem Gewebe. Im Anschluss an die Fixierung wurden von den Herzen im Kryostat 12 µm große Schnitte auf Super-Frost Ultra Plus Objektträger angefertigt. Aufgrund der Fixierung waren viele Epitope in den Geweben maskiert und somit für die Antikörper nicht mehr erreichbar. Daher wurden die Epitope durch zweimaliges Waschen in 0,1 M Tris-Puffer (pH7, 4) und Kochen in Zitratpuffer (pH 6,0) bei 96°C für 45 Minuten demaskiert. Nach Abkühlen auf 35°C wurden die Schnitte erneut zweimal in 0,1 M Tris-Puffer (pH7, 4) gewaschen und der Primärantikörper konnte aufgetragen werden.

2.2.3.2. Isopentan-Fixierung

Manche Antikörper konnten mit der AFA-Fixierung nicht genutzt werden, da die Antigene durch die Fixierung maskiert waren und die Demaskierung durch das Kochen im Zitratpuffer nicht ausreichend war. In diesem Fall wurde das entnommene Herz in -80°C gelagertem Isopentan für 5 Minuten fixiert und im Anschluss direkt in $11\text{ }\mu\text{m}$ große Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden bei -20°C für zehn Minuten in Aceton fixiert und daraufhin 5 Minuten in 0,2%-igem Triton gewaschen, um die Antigene vollständig zugänglich zu machen. Nach zweimaligem Waschen in 1xPBS konnte der Primärantikörper aufgetragen werden.

2.2.3.3. Immunfluoreszenz-Färbung

Um bestimmte Proteine im Herzmuskelgewebe nachzuweisen, wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung genutzt. Bei dieser Methode bindet ein zweiter, farbstoffmarkierter Antikörper (Sekundärantikörper) an den spezifisch-gebundenen Primärantikörper, der somit durch Epifluoreszenz- oder Lasermikroskopie nachgewiesen und dokumentiert werden kann. Diese Zweitantikörper emittieren bei einer bestimmten Wellenlänge. Im Falle der AFA-Fixierung wurde der Primärantikörper entsprechend mit 0,1 M Tris-Puffer (pH7,4), 5% NDS (*normal-donkey-serum*) und 0,3%igem Triton-X100 auf die Endkonzentration verdünnt. Das Eselserum diente der Maskierung von unspezifischen Bindungen. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal zehn Minuten mit 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,4) gewaschen, um den Primärantikörper vollständig zu entfernen. Der Zweitantikörper wurde entsprechend seiner Verdünnung (nur mit 0,1 M Tris-Puffer) aufgetragen und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben erneut dreimal zehn Minuten in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,4) gewaschen und zum Schluss mit Elvanol-bestrichenen Deckgläschen abgedeckt.

Bei der Isopentan-Fixierung wurden beide Antikörper lediglich entsprechend mit 1xPBS auf ihre Endkonzentration verdünnt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper dauerte 1 Stunde. Nachdem die Proben dreimal 5 Minuten in 1xPBS gewaschen waren, wurden sie für 45 Minuten mit dem Zweitantikörper inkubiert. Anschließend folgte eine zweimalige Waschung in 1xPBS und einmal 5 Minuten in 100%-igem Ethanol. Die Objektträger konnten nun mit Elvanol-bestrichenen Deckgläschen eingedeckt werden.

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbung wurde mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie durchgeführt. Dies wurde mit einem Leica TCS SP5 Mikroskop-System und der Software ImagePro Plus gemacht. Anschließend wurden die Bilder weiter mit Adobe Photoshop CS3 bearbeitet.

2.2.4. Histologische Methoden

2.2.4.1. Formalin-Fixierung und Paraffineinbettung

Die Herzen wurden zur Fixierung für 24 Stunden in 4%igem neutralgepuffertem Formalin (NBF) eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet.

Vor der Einbettung wurde das Fixierungsmittel Formalin mit Wasser ausgewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach wurde der Alkohol durch Einlegen in Methylbenzoat entfernt. Anschließend wurde das Gewebe in Benzol gehärtet und mit Benzol-Paraffin durchtränkt. Nun erfolgte die eigentliche Einbettung in Paraffin.

Im Anschluss wurden die Gewebe durch das Mikrom in 5-8 µm große Schnitte geschnitten und nach Entparaffinierung gefärbt.

Tabelle 36: Schema Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Entparaffinierung	
Xylol	10 Minuten
Xylol	10 Minuten
96% Ethanol	5 Minuten
70% Ethanol	5 Minuten
50% Ethanol	5 Minuten
Aqua dest.	Sammeln
Färbung	
Hämatoxylin	15 Minuten (mikroskopische Kontrolle)
Bläuen unter laufendem Leitungswasser	10 Minuten
Eosin	10 Minuten
Aqua dest.	Abspülen
Entwässern	
70% Ethanol	5 Minuten
96% Ethanol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Eindecken mit Histokit	

Tabelle 37: Schema Azan-Färbung

Entparaffinierung	
Xylol	10 Minuten
Xylol	10 Minuten
96% Ethanol	5 Minuten
70% Ethanol	5 Minuten
50% Ethanol	5 Minuten
Aqua dest.	Sammeln
Färben	
Anilinalkohol	3 Minuten
Azokarminlösung (Wärmeschrnk 56°C)	15 Minuten
Aqua dest.	Abspülen
Anilinalkohol	Differenzierung unterm Mikroskop
Essigsaurer Alkohol	5 Minuten
Aqua dest.	Abspülen
5% ige Wolframphosphorsäure	1 Stunde bei 56° im Wärmeschrnk
Aqua dest.	Abspülen
Anilinblau-Orange-Gemisch	45 Minuten
Aqua dest.	Abspülen
96% Ethanol	Differenzieren
Entwässern	
70% Ethanol	5 Minuten
96% Ethanol	5 Minuten
Xylol	10 Minuten
Eindecken mit Histokit	

2.2.4.2. Apoptosefärbung (ISOL-Färbung)

Der Nachweis von apoptotischen Zellbestandteilen wurde mit Hilfe des ApopTagTMPeroxidase ISOL Kit erbracht.

Der Mechanismus basiert auf der biochemischen Spezialisierung des Enzyms T4-DNA-Ligase. Es verbindet die freien Enden der doppelsträngigen Proben-DNA mit denen der synthetischen, biotinylierten Oligonukleotide des ISOL-Kit. Durch die Bindung an ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, welches das Substrat Diaminobenzidin umsetzt, kann die Reaktion mittels Durchlichtmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Die Oligonukleotide des ISOL-Kits enthalten zwei komplementäre Basensequenzen, die spontan ein doppelsträngiges Segment bilden. Dabei können sich die erst einzelsträngigen Nukleotide zu zwei unterschiedlichen doppelsträngigen Segmenten zusammenlagern. Es bilden sich aus einem 5'-und einem 3'-Ende, entweder ein „stumpfes“ (Oligo B) oder ein „überhängendes“ Ende (Oligo A, am besten für Paraffineinbettung). Es wurde nachgewiesen, dass eine doppelsträngige DNA mit einer überhängenden Base am 3'-Ende typisch für Apoptose ist. Die Spezifität dieses Systems beruht auf dem Enzym T4-DNA-Ligase, das speziell DNase I-Typ-Enden mit den biotinmarkierten Oligonukleotiden ligiert. Am anderen Ende der nun doppelsträngigen Oligonukleotide befindet sich eine Haarnadelsekundärstruktur, an der eine Biotinmarkierung hängt. Das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat bindet an das Biotinende des Oligonukleotids. Durch die Peroxidase wird das Substrat DAB umgesetzt und es bildet sich an den Stellen mit Apoptose eine braune Ablagerung.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Gewebeproben für 24 Stunden in 4%-igem Neutralpufferformalin fixiert, in Paraffin eingebettet und am Mikrotom in 8 µm große Schnitte geschnitten. Die Proben wurden entparaffiniert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Proteinase K inkubiert. Es wurde zuvor eine 50 µg/ml Verdünnung mit 1xPBS hergestellt. Pro Schnitt wurden 50 µl aufgetragen. Des Weiteren wurde eine Lösung aus T4-DNA-Ligase und Oligo A-Nukleotiden zusammengefügt, wobei für einen Schnitt eine Verdünnung aus 54 µl Oligo A und 6 µl Enzym hergestellt wurde. Durch Mischen von 147 µl DAB-Puffer pro Schnitt mit 3 µl DAB-Substrat entstand die Peroxidase-Substrat-Lösung. Beide Lösungen wurden bis zur Nutzung auf Eis gekühlt.

Tabelle 39: Protokoll ISOL-Färbung

Entparaffinierung	
Xylol	3 x 5 Minuten
100% Ethanol	1 x 5 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
75% Ethanol	3 Minuten
Gewebevorbereitung	
1xPBS	kurz waschen
3% Wasserstoffperoxid	5 Minuten
1xPBS	im Rinnsal darüber laufen lassen
Aqua dest.	2 x 2 Minuten
50 µl Proteinase K pro Schnitt	15 Minuten
1xPBS	im Rinnsal darüber laufen lassen
Aqua dest.	2 x 2 Minuten
Färbung	
30 µl Equilibration-Puffer pro Schnitt	30 Sekunden
60 µl T4-DNA-Ligase pro Schnitt	10-16 Stunden in einer feuchten Kammer
1xPBS	im Rinnsal darüber laufen lassen
Aqua dest.	3 x 10 Minuten
50 µl Streptavidin-Peroxidase	30 Minuten bei RT
1xPBS	im Rinnsal darüber laufen lassen
1xPBS	3 x 5 Minuten
50 µl Peroxidase-Substrat pro Schnitt	10 Minuten bei RT
Aqua dest.	im Rinnsal darüber laufen lassen
Aqua dest.	2 x 2 Minuten
Gegenfärbung	
0,5% Methylgrün	10 Minuten
Aqua dest.	3 x 10 Sekunden
100% Butanol	3 x 30 Sekunden
Eindecken mit Histokit	

2.2.5. Elektronenmikroskopie

Die Gewebestückchen wurden in frisch angesetzter Karnovsky Lösung für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal für 15 Minuten in 6,9% Sucrose-enthaltendem PBS gewaschen worden. Zur Postfixation wurden die Gewebestückchen in 2%-igem Osmiumtetroxid (in PBS gelöst) inkubiert. Es folgte eine dreimalige Dehydrierung in 50 %-igem Ethanol für jeweils 15 Minuten. Über Nacht wurden die Proben in 70%-igem Ethanol inkubiert, das mit 0,5% Uranylacetat und 1% Wolframatophosphorsäurehydrat angereichert war. Anschließend folgte eine Inkubation in aufsteigender Ethanolreihe (80 %, 90 %, 96 %) für jeweils zweimal zehn Minuten und einer Inkubation von dreimal 20 Minuten in 100%-igem Ethanol. Daraufhin wurden die Gewebestücke für 15 Minuten mit Propylenoxid behandelt und in Epoxy Resin eingebettet. Das Epoxy Resin muss 3 Tage bei 60°C polymerisieren und anschließend getrimmt werden, um überschüssiges Kunstharz zu entfernen. Mit Hilfe eines Ultramikrotoms und eines Diamantmessers wurden 50 nm dünne Transversalschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Kupfergrids übertragen, die mit Formvar beschichtet waren. Diese Schnitte wurden in 8 %-iger Uranylacetatlösung für 8 Minuten inkubiert, um eine Nachkontrastierung zu erreichen und anschließend 1 Minute in Reynold'scher Bleizitratlösung behandelt. Zum Schluss wurden die Präparate im Transmissionselektronenmikroskop (EM 906) betrachtet und dokumentiert.

2.2.6. Tierexperimentelle Techniken

2.2.6.1. Haltung und Zucht von Labormäusen

Die Haltung und Zucht der Labormäuse wurde im Tierstall des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Johannes Gutenberg-Universität durchgeführt. Die Arbeit im Tierstall umfasste das Verpaaren der geschlechtsreifen Mäuse miteinander, das Absetzen der Jungtiere nach ungefähr drei Wochen in neue, nach Geschlechtern getrennte Haltungsboxen, das Markieren der Jungtiere mit Ohrmarken der Firma Hauptner & Herberholz und die Injektion der Versuchstiere mit Tamoxifen.

In der Regel wurden zwei weibliche Mäuse mit einer männlichen Maus zur Verpaarung zusammengesetzt, um eine möglichst hohe Nachwuchsausbeute zu erreichen. Mäuse werfen nach einer Tragzeit von 21 Tagen zwischen 6 und 16 Jungtiere, wobei die maximale Anzahl von 12 Jungtieren pro weibliche Maus nie überschritten wurde. Da nach 3 Wochen nach der Verpaarung mit einer deutlichen Abrundung des weiblichen Mäuseabdomens im Fall einer

Konzeption gerechnet werden konnte, wurden die Mäuse nach dieser Zeitspanne kontrolliert und schwangere Weibchen separiert, um den Stress zu minimieren. Nach weiteren 3-4 Wochen wurden die Jungtiere von der Mutter getrennt. Gleichzeitig wurden sie mit einer Ohrmarke markiert und von jedem Jungtier eine Schwanzbiopsie für die Genotypisierung gewonnen. Erst frühestens zwei Wochen nach der Geburt wurden die Weibchen erneut verpaart, um eine vollständige Wiederherstellung des Uterus zu gewährleisten und somit die Konzeptionsrate zu verbessern.

Kranke Tiere oder Tiere, die für die Experimente genutzt wurden, wurden durch CO₂-oder Isofluran-Begasung getötet. Die Tiere blieben für mindestens zehn Minuten im Begasungsbad. Der Tod durch Herzversagen trat meist unmittelbar nach Eintritt in die Betäubungsphase ein.

2.2.6.2. Injektion von Tamoxifen zur Induktion der Cre-Rekombinase

Tamoxifen ist eine lipophile Substanz und musste deshalb in Fett gelöst werden, um vom Empfängertier möglichst quantitativ aufgenommen zu werden. In diesem Fall wurde Tamoxifen in Erdnussöl gelöst, dass zuvor autoklaviert wurde. Jeder zu induzierenden Maus wurden täglich 2 mg Tamoxifen intraperitoneal gespritzt. Um insgesamt 5 ml Emulsion herzustellen, wurden 50 mg Tamoxifen in 300 µl 100%-igem Ethanol und 4,7 ml Erdnussöl durch Mischen im Ultraschallgerät (Branson Sonifier 250) gelöst. Vor jeder Injektion wurde die Emulsion erneut mit dem Ultraschallgerät gemischt. Jeder Maus wurden 200 µl durch Micro-FineTM-Demi Insulin Spritzen in die Bauchhöhle gespritzt. Je nach Protokoll wurden die Tiere über 5 Tage, 3 Wochen oder 5 Wochen gespritzt. Die Tiere, die länger als 5 Tage behandelt wurden, bekamen ab der 2. Woche nur noch 100 µl Emulsion gespritzt und nach jeder Woche wurde eine Erholungspause von 2 Tagen eingelegt. Nach einer Pause von drei Tagen am Ende wurden die Tiere für die Experimente getötet. Die Tiere wurden während der Experimentierphase einzeln gehalten und täglich beobachtet und auf ihr Allgemeinbefinden hin überprüft. Tiere, denen es schlecht ging, wurden vorzeitig getötet und obduziert.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Induzierbarkeit der konditionalen DSG2-Mutanten

Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Auswirkungen das Fehlen der Exone 4-6 des Desmoglein 2-Gens auf die Funktion und Morphologie des Herzens hat. Um dies zu bewerkstelligen, sollten die transgenen Mäuse, von Dr. Bastian Holthöfer (siehe 1.10.) eingehend untersucht werden. Da es sich bei diesen Mäusen, um eine konditionale, gewebespezifische Mutation handelte, konnte das Fehlen dieses Genabschnittes für einen bestimmten Zeitraum untersucht werden. Um die Veränderungen in den Herzen der konditional mutierten Tiere in einem bestimmten Zeitfenster optimal beurteilen zu können, wurde ein Protokoll erstellt. Die Tiere wurden in Gruppen eingeteilt und unterschiedlich lange mit dem Liganden Tamoxifen behandelt. Die erste Gruppe wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen mittels intraperitonealer Injektion von Tamoxifen in die Bauchhöhle (*i.p.*) induziert. Im Anschluß folgte eine Pause von 2 Tagen. Am 3. Tag wurden die Tiere dieser Gruppe getötet und obduziert. Die zweite Gruppe wurde über einen Zeitraum von 5 Wochen mit dem Induktor Tamoxifen behandelt. Dabei erhielten die Tiere nach jeweils 5 Tagen eine Pause von 2 Tagen, um sich von den Injektionen zu erholen. Nach 5 Wochen wurden diese Tiere getötet und obduziert. Zusätzlich musste das Rezept für die Aufbereitung des als Trockensubstanz vorliegenden Medikaments Tamoxifen verbessert werden, da in einem ersten Versuch keine ausreichende Rekombination des DSG2-Allels im Herzen gezeigt werden konnte. Die Konzentration von Tamoxifen wurde von 1 mg (in 100 µl Emulsion) auf 2 mg (200 µl Emulsion) je Injektion erhöht. Anstelle von Sonnenblumenöl wird Erdnussöl als Emulsionsmedium gewählt. Tiere, die mit der neuen Rezeptur behandelt wurden, zeigten zuverlässig eine Rekombination des DSG2-Allels im Herzen (Abbildung 7). Um die erfolgreiche Rekombination zu kontrollieren, wurden jeweils 2 Tiere pro Gruppe lediglich mit Erdnussöl behandelt. Diese Tiere dienten als Negativkontrolle. Um die Intaktheit der aus den Herzen aufgereinigten DNA zu dokumentieren, wurde die Erbinformation für GAPDH nachgewiesen.

Tabelle 40: Rezept Tamoxifen

Gruppe 1 (5 Tiere; 5 Tage Induktion)	Gruppe 2 (5 Tiere; 5 Wochen Induktion)	Gruppe 3 (2 Tiere pro Gruppe, Negativkontrolle)
50 mg Tamoxifen in 300 µl Ethanol durch Vortexen lösen, mit 4,7 ml Erdnussöl, mittels Ultraschall lösen.	Insgesamt 150 mg Tamoxifen in 900 µl Ethanol durch Vortexen lösen, mit 14,1 ml Erdnussöl, mittels Ultraschall lösen (in diesem Fall wurden die Emulsionen pro Woche frisch angesetzt)	Bsp: 5 Wochen, 1,2 ml Erdnussöl
Injektion von 200 µl Emulsion pro Tier und Tag über aufeinanderfolgende Tage, im Anschluss 2 Tage Pause.	Injektion von 200 µl Emulsion pro Tier und Tag in den ersten 5 Tagen, anschließend 2 Tage Erholungspause, ab der 2. Woche 100 µl Emulsion pro Tier und Tag, nach jeweils 5 Tagen wurde eine Pause von 2 Tagen eingelegt	Injektion von 200 µl Erdnussöl in den ersten 5 Tagen, anschließend 2 Tage Pause, ab der 2. Woche 100 µl Emulsion pro Tier und Tag, nach jeweils 5 Tagen wurde eine Pause von 2 Tagen eingelegt

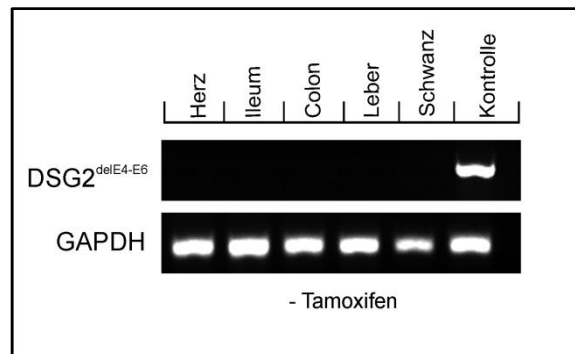
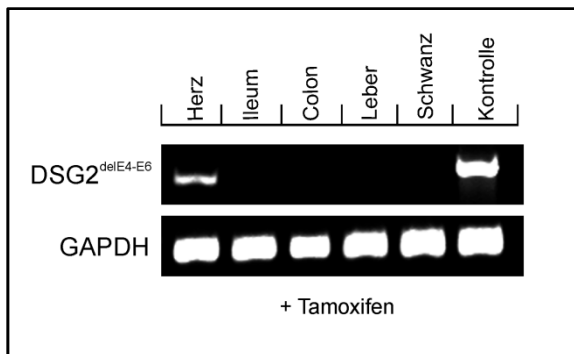


Abbildung 7: PCR-Analyse auf erfolgreiche Rekombination des DSG2-Lokus: es wurden Gewebeproben aus Herz, Dünndarm, Dickdarm, Leber und Schwanz aus der Gruppe, der über 5 aufeinanderfolgenden Tagen induzierten konditionalen Mutanten entnommen und mittels PCR-Analyse auf eine erfolgreiche Rekombination des DSG2-Allels (DSG2^{delE4-E6}) überprüft. **Links:** Wie zu erwarten, konnte lediglich ein PCR-Produkt des rekombinierten Lokus aus der DNA-Probe des Herzens detektiert werden. **Rechts:** Die DNA-Proben aus der Negativkontrolle zeigten in keinem Fall eine Rekombination des DSG2-Allels. Für die Kontrolle der Intaktheit der DNA diente der Nachweis von GAPDH.

3.2. Generierung und Genotypisierung einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante

Um die „Langzeitwirkung“ der Mutation untersuchen zu können, sollten die betroffenen Exone über einen viel längeren Zeitraum fehlen als lediglich über 5 Wochen, wie es bei den konditionalen Mutanten maximal der Fall war. Aus diesem Grund wurde eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante gezüchtet.

Die von Dr. Bastian Holthöfer generierten homozygoten „*gefloxt*“ Tiere (siehe 1.10.) wurden mit Tieren verpaart, die Träger der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines β -Aktinpromotors waren. Diese transgenen Tiere zeichneten sich dadurch aus, dass durch β -Aktin die Aktivität des Enzyms Cre-Rekombinase kontrolliert wurde, sodass in allen β -Aktin-exprimierenden Geweben, der von den loxP-Sequenzen flankierte DNA-Abschnitt (Exone 4-6) herausgeschnitten und neu rekombiniert wurde. Da β -Aktin ubiquitär vorkommt, wurde die Mutation in allen Geweben, insbesondere auch im Herzen ausgelöst. Die Rekombination fand bereits in der Keimbahn statt, sodass die rekombinierten Allele nach weiteren Verpaarungen stabil vererbt wurden, ohne dass die Rekombination des Desmoglein 2-Gens weiterhin, von der Aktivität der Cre-Rekombinase abhängig war. Nachdem diese Mäuse bis zur Homozygotie verpaart worden waren, fehlten die Exone 4-6 des Desmoglein 2-Gens bereits bei der Geburt. Es bestand nun die Möglichkeit die längerfristigen Auswirkungen der Mutation zu untersuchen.

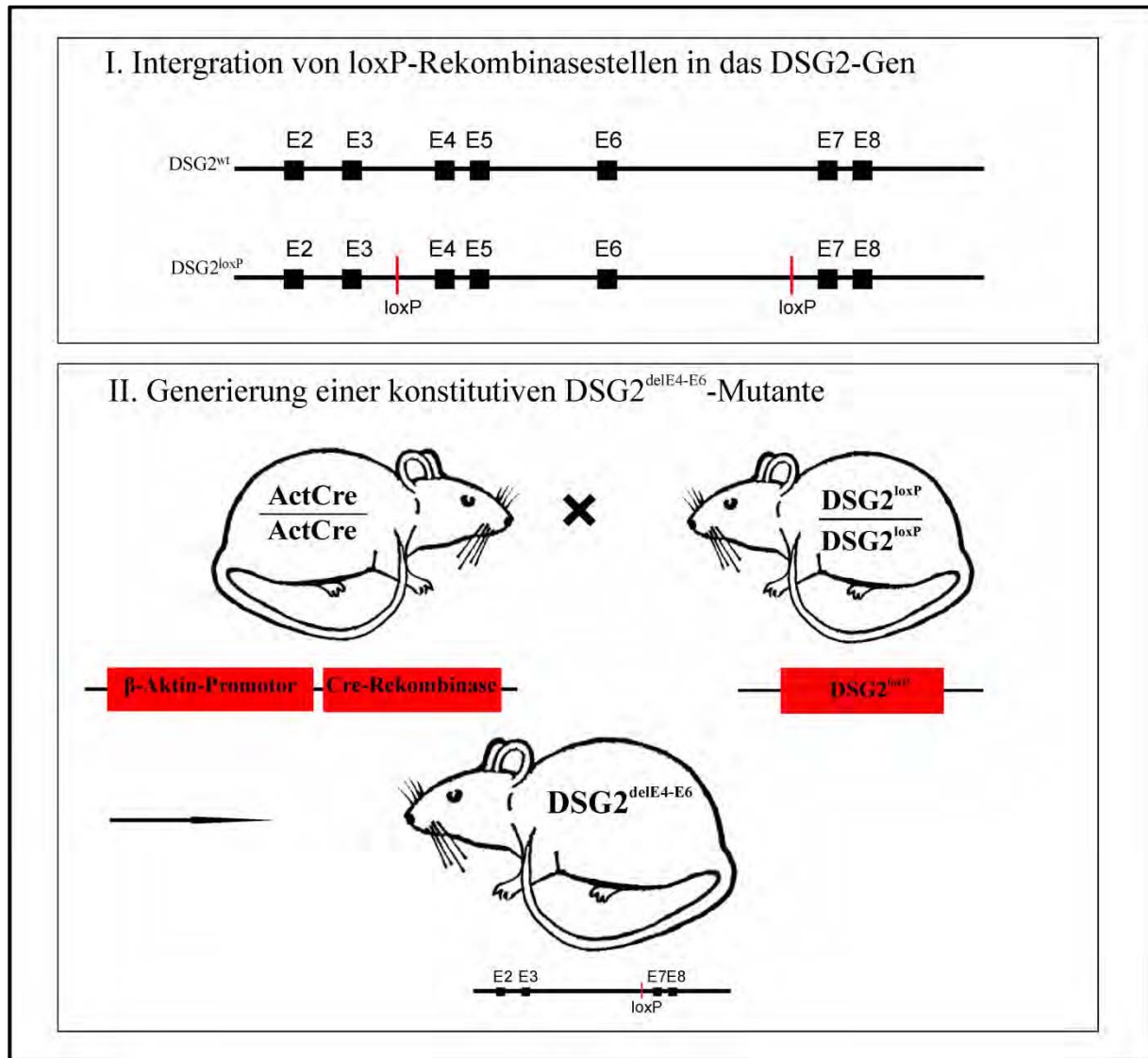


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Generierung einer konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante: (I) Damit die Exone 4-6 des DSG2-Gens induzierbar rekombiniert werden können, wurden diese von zwei loxP-Sequenzen flankiert (siehe 1.10.). Der zwischen den loxP-Sequenzen liegende DNA-Abschnitt wird von dem Enzym Cre-Rekombinase herausgeschnitten und die verbleibenden Sequenzen neu rekombiniert. (II) Homozygote Nachkommen dieser „geflochten“ Tiere wurden mit homozygoten Trägern des ActCre-Rekombinase-Systems verpaart, welches durch einen β -Aktin-Promotor gesteuert wird. Nachkommen dieser Verpaarung exprimieren die Cre-Rekombinase bereits in der Keimbahn, sodass das DSG2-Gen ubiquitär rekombiniert wird. Diese Linie wurde verpaart, bis die Nachkommen homozygote Träger des „geflochten“ Allels waren und das DSG2-Gen somit nur noch in rekombinierter Form vorlag ($DSG2^{\text{delE4-E6}}$).

Die transgenen Mäuse sollten bis zur Homozygotie der mutierten Allele gezüchtet werden, um die Auswirkungen der Mutation zu maximieren und um bestmögliche Untersuchungsergebnisse zu erzielen. Um die transgenen Allele nachzuweisen, wurden sämtliche Nachkommen einer Genotypisierung per PCR-Analyse mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien unterzogen.

Zu Beginn des Zuchtprogramms stand die Verpaarung der Elterngeneration. Diese bestand aus einem homozygoten „*gefloxten*“ Weibchen und einem homozygoten Männchen, das Träger der Information für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines β -Aktin-Promotors war. Die Nachkommen dieser Verpaarung (F1-Generation) sollten laut den Mendel'schen Gesetzen der Vererbungslehre heterozygot für beide Allele sein, da sie voraussichtlich einen „*gefloxten*“ DSG2-Lokus, einen wildtypischen DSG2-Lokus und ein Allel für die Information der Cre-Rekombinase tragen sollten. Aus diesem Grund sollte eine erfolgreiche Rekombination des DSG2-Lokus nachweisbar sein. Um die Rekombination nachzuweisen, wurde eine PCR-Analyse mit spezifischen Primer durchgeführt. Die Oligonukleotide (03-86 und 03-58_3'rev) binden an die Sequenzen der Introne 3 und 7 des DSG2-Gens, sodass nach erfolgreicher Rekombination ein 860 bp großes PCR-Produkt amplifiziert wird (Abbildung 9).

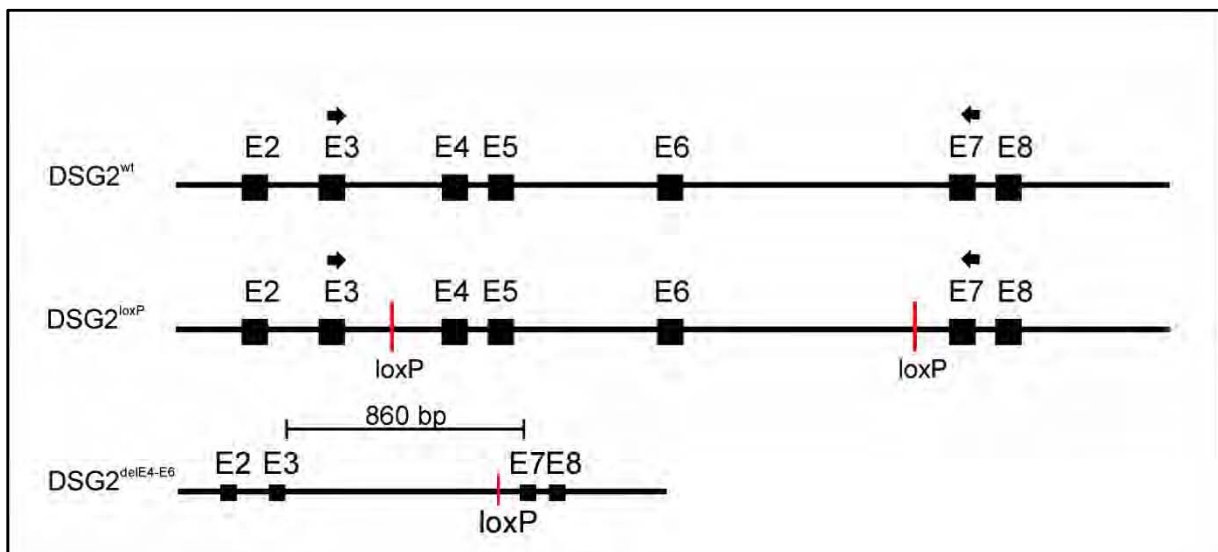


Abbildung 9: PCR-Analyse des rekombinierten DSG2-Lokus: das Enzym Cre-Rekombinase schneidet den von loxP-Sequenzen flankierten Bereich der DNA heraus und rekombiniert das Gen neu, sodass ein PCR-Produkt von 860 bp entsteht. E2-E8: Exone 2-8

Um die erfolgreiche Rekombination des DSG2-Lokus in der heterozygoten F1-Generation zu bestätigen, wurde eine weitere PCR-Analyse durchgeführt, die eine erfolgreiche Integration der 5'-loxP-Sequenz in den DSG2-Lokus verifiziert. Dabei bindet der Vorwärtsprimer (03-

91) innerhalb der 5'-loxP-Sequenz und der Rückwärtsprimers (03-92) im Exon 4 des DSG2-Allels, sodass das PCR-Produkt eine Größe von 925 bp aufweist (Abbildung 10).

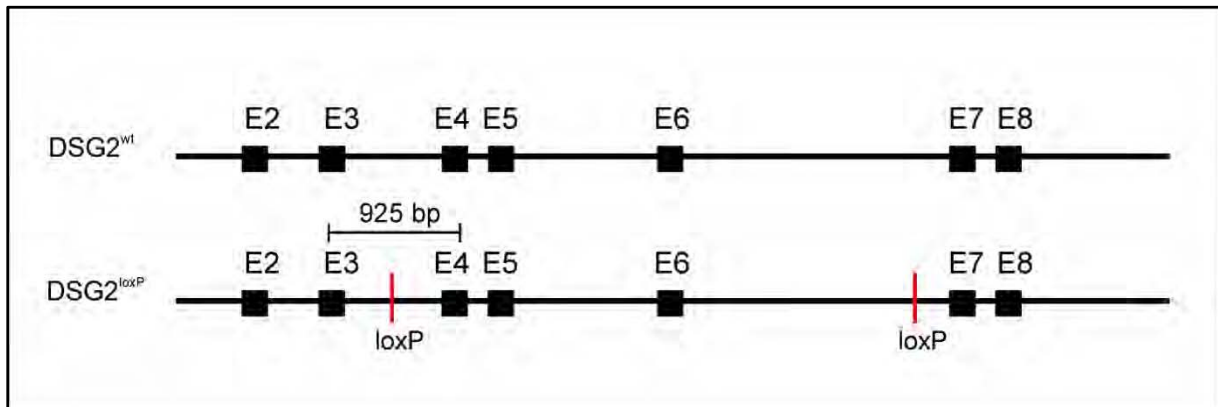


Abbildung 10: PCR-Analyse auf erfolgreiche Integration der 5'-loxP-Sequenz in den DSG2-Lokus: Durch die Bindungsstelle des Vorwärtsprimers (03-91) innerhalb der loxP-Sequenz wird die erfolgreiche Integration der loxP-Sequenzen in das DSG2-Allel durch diese PCR-Analyse nachgewiesen. E2-E8: Exone 2-8

Da der Rückwärtsprimer dieser PCR-Analyse innerhalb des zu rekombinierenden Bereichs des DSG2-Allels (Exon 4) liegt, kann man davon ausgehen, dass bei der F1-Generation der $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutationsträger kein PCR-Produkt gebildet wird. Diese Tiere besitzen ein Allel für die Cre-Rekombinase, sodass dieses Enzym den flankierten Bereich ausschneidet und die Nachkommen ein wildtypisches und ein rekombiniertes DSG2-Allel besitzen. Mithilfe einer weiteren PCR-Analyse wurde die erfolgreiche Vererbung des Transgens der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des β -Aktin-Promotors nachgewiesen (Abbildung 11). Wie nach den Mendel'schen Gesetzen der Vererbung zu erwarten war, waren alle Nachkommen positiv für das Transgen.

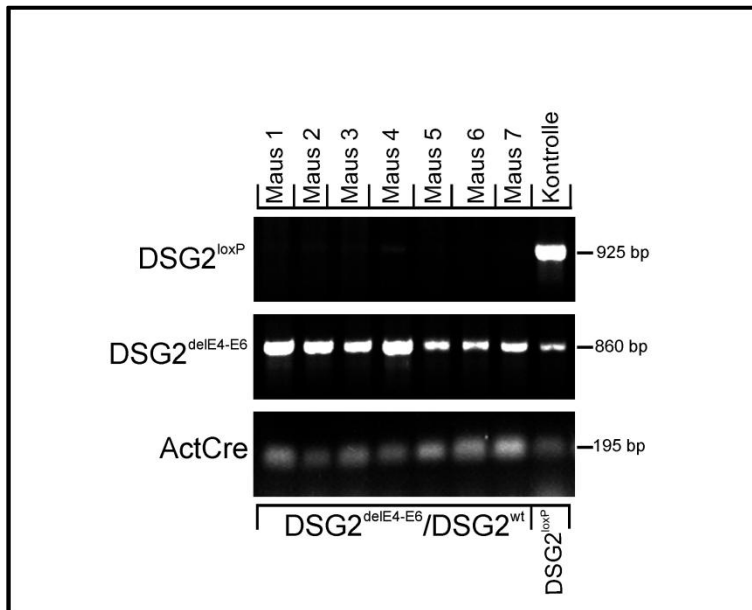


Abbildung 11: Genotypisierung der F1-Generation der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante mittels PCR-Analyse:

$DSG2^{\text{loxP}}$: Da der Einbau der loxP-Sequenzen in das DSG2-Gen mittels homologer Rekombination durchgeführt wurde (siehe 1.10.), ist der Integrationsort des Transgens bekannt und kann mit Hilfe spezifischer Primer genau überprüft werden. Die PCR-Analyse $DSG2^{\text{loxP}}$ weist dieses „gefloxte“ DSG2-Gen nach und es bildet sich ein 925 bp umfassendes PCR-Produkt. **$DSG2^{\text{delE4-E6}}$:** Die erfolgreiche Rekombination des DSG2-Allels ($DSG2^{\text{delE4-E6}}$) wurde über eine weitere PCR nachgewiesen, bei der sich ein spezifisches, 860 bp umfassendes PCR-Produkt bildet. Im Falle der ersten Nachkommen (F1-Generation) von Tieren, die homozygot das „gefloxte“ DSG2-Allel tragen und Tieren, die homozygot die Erbinformation für die Cre-Rekombinase, unter der Kontrolle des β -Aktinpromotors enthalten, konnte eine erfolgreiche Rekombination des DSG2-Allels ($DSG2^{\text{delE4-E6}}$) für alle Nachkommen nachgewiesen werden. Das Fehlen eines PCR-Produktes für das „gefloxte“ DSG2-Allel ($DSG2^{\text{loxP}}$) bei allen Nachkommen bestätigt, dass die flankierte DNA-Sequenz des DSG2-Allels vollständig herausgeschnitten wurde. Die F1-Generation zeigte somit eine Vererbung nach den Mendel'schen Regeln und man konnte davon ausgehen, dass diese Tiere Träger eines wildtypischen und eines rekombinierten DSG2-Allels waren und somit heterozygot für den neu rekombinierten DSG2-Abschnitt ($DSG2^{\text{delE4-E6}}/DSG2^{\text{wt}}$). **ActCre:** Die PCR zum Nachweis der erfolgreichen Vererbung der Information für die Cre-Rekombinase (ActCre) wurde zusätzlich durchgeführt und zeigte ein PCR-Produkt für alle Nachkommen.

Da die Nachkommen der transgenen Linie homozygote Träger des „gefloxten“ Allels sein sollten, wurden die Tiere der F1-Generation miteinander verpaart. Nach der Mendel'schen Vererbungslehre sind in der F2-Generation heterozygote und homozygote Nachkommen im Bezug auf das „gefloxte“ DSG2-Allel und homozygote wildtypische Tiere

im Verhältnis 1:1:2 zu erwarten. Um zwischen den einzelnen Allelen diskriminieren zu können, reichte die PCR-Analyse auf erfolgreiche „Integration der 5'-loxP-Sequenz in das DSG2-Allel“ und auf „Rekombination des DSG2-Lokus“ nicht aus. Es wurde eine weitere PCR-Reaktion (Zygotiezustand des loxP-Allels) angewendet, die zwischen „gefloxtem“ und wildtypischem DSG2-Lokus unterscheiden sollte. Dabei lag der Vorwärtsprimer (03-61b) dieser

PCR-Analyse im Intron 3 des DSG2-Gens, der Rückwärtsprimer (03-92), wie bei der PCR auf „Integration der 5'-loxP-Sequenz“, im Exon 4 (Abbildung 12). Da die loxP-Sequenz innerhalb des Introns 3 des DSG2-Allels integriert wurde, bildete sich im Falle eines „gefloxten“ Allels ein 50 bp größeres PCR-Produkt als im Falle des wildtypischen DSG2-Allels (Abbildung 12). Da bei der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante der flankierte Bereich

bereits herausgeschnitten wurde, wurde bei heterozygoten deletierten und wildtypischen Tieren ein PCR-Produkt für den wildtypischen DSG2-Lokus gebildet, nicht aber für das „gefloxte“ Allel. Für homozygote Nachkommen war kein PCR-Produkt nachweisbar, da diese Tiere weder ein wildtypisches Allel noch ein „gefloxtes“ Allel besaßen. In diesen Tieren lag das DSG2-Gen nur noch in rekombinierter, homozygoter Form vor.

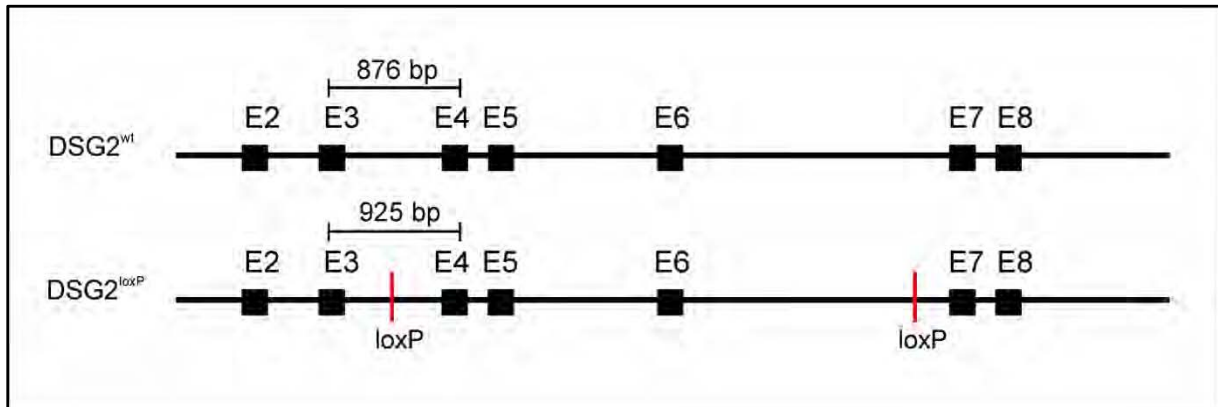


Abbildung 12: PCR auf Zygotiezustand des loxP-Allels: durch die Insertion der 50 bp umfassenden loxP-Sequenz in das DSG2-Gen lässt sich das „gefloxte“ Allel ($DSG2^{loxP}$) vom wildtypischen Allel ($DSG2^{wt}$) unterscheiden. Im Falle der Heterozygotie bildet sich ein PCR-Produkt für das wildtypische Allel (876 bp) und ein PCR-Produkt für das „gefloxte“ Allel (925 bp). Im Fall von Homozygotie entsteht lediglich eine Bande für das „gefloxte“ Allel.

Um exakt zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren unterscheiden zu können, wurde zur Genotypisierung der F2-Generation eine Kombination aus der PCR-Analyse auf „Rekombination des DSG2-Lokus“ und der PCR-Analyse auf „Zygotiezustand des DSG2-Allels“ angewandt. Die homozygoten Nachkommen zeigten in der PCR-Analyse auf „Rekombination des DSG2-Lokus“ ein PCR-Produkt. In der PCR-Analyse auf „Zygotiezustand des DSG2-Allels“ entstand keine Bande, da diese Tiere weder ein wildtypisches noch ein „gefloxtes“ Allel besaßen. Im Fall der Heterozygotie konnte ein PCR-Produkt für das wildtypische Allel nachgewiesen werden und gleichzeitig zeigte sich eine Bande für den rekombinierten DSG2-Lokus. Bei den wildtypischen Tieren blieb eine positive Reaktion der PCR-Analyse auf „Rekombination des DSG2-Lokus“ aus. In diesem Fall entstand nur eine Bande für das wildtypische Allel in der PCR-Analyse auf „Zygotiezustand des loxP-Allels“.

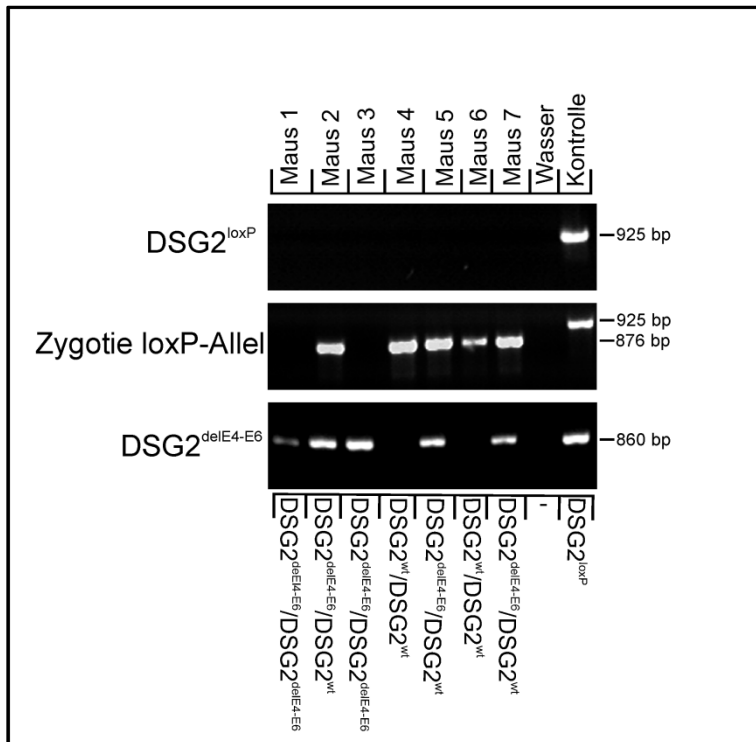


Abbildung 13: Genotypisierung der F2-Generation mittels PCR-Analyse:

Für die Nachkommen der Verpaarung aus der F1-Generation sind für das rekombinierte DSG2-Allel (DSG2^{delE4-E6}) heterozygote und homozygote Nachkommen und wildtypische Tiere im Verhältnis 1:1:2 zu erwarten. **DSG2^{loxP}:** Die PCR-Analyse zum Nachweis des „gefloxten“ DNA-Abschnitts zeigt bei keinem Tier ein PCR-Produkt. **Zygotie loxP-Allel:** Diese PCR-Methode diskriminiert zwischen wildtypischem DSG2-Allel (876 bp) und „gefloxtem“ DSG2-Allel (925 bp). **DSG2^{delE4-E6}:** Diese PCR weist das rekombinierte DSG2-Allel nach. Heterozygote Tiere bilden ein PCR-Produkt für das rekombinierte DSG2-Allel (DSG2^{delE4-E6}) und ein PCR-Produkt für das wildtypische DSG2-Allel. Homozygote Tiere bilden lediglich ein PCR-Produkt für das rekombinierte DSG2-Allel. Wildtypische Nachkommen zeigen keine Rekombination und bilden ein Produkt für das wildtypische DSG2-Allel (876 bp).

Um die Homozygotie des rekombinierten DSG2-Allels zu stabilisieren und um die Anzahl an homozygoten Nachkommen zu maximieren, wurden die homozygoten Tiere der F2-Generation miteinander verpaart. Deren Nachkommen (F3-Generation) zeigten alle ein PCR-Produkt in der Analyse auf „Rekombination des DSG2-Lokus“ und bildeten keine Bande in der PCR-Analyse auf „Zygotiezustand des loxP-Allels“ (Abbildung 14).

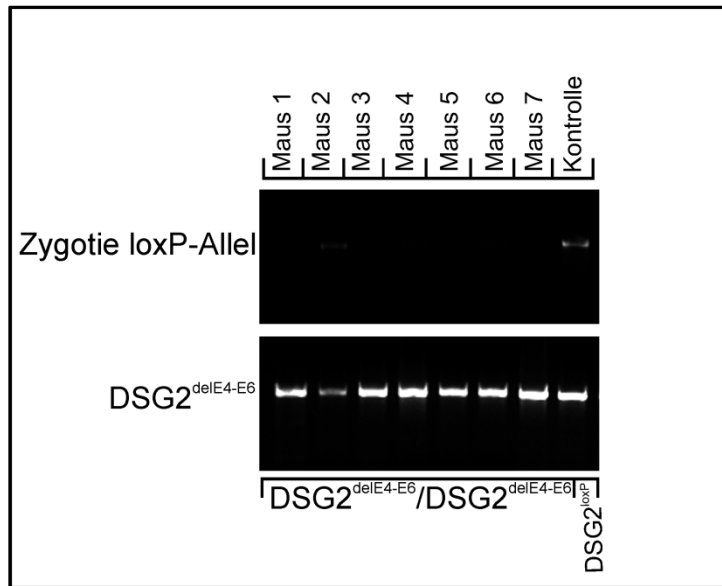


Abbildung 14: Genotypisierung der F3-Generation mittels PCR-Analyse: Die F3-Generation wurde durch Verpaarungen von, für das rekombinierte DSG2-Allel homozygoten Nachkommen der F2-Generation gezüchtet. Nach den Mendel'schen Gesetzen der Vererbung sind für das rekombinierte DSG2-Allel ($DSG2^{\text{delE4-E6}}$) nur noch homozygote Nachkommen zu erwarten. **Zygotie loxP-Allel:** Bei den homozygoten Tieren bildet sich weder ein PCR-Produkt für das wildtypische DSG2-Gen noch ein PCR-Produkt für das „gefloxte“ DSG2-Gen. **$DSG2^{\text{delE4-E6}}$:** Bei allen homozygoten Nachkommen bildet sich eine Bande für das rekombinierte DSG2-Allel.

3.3. Rekombination des Desmoglein 2-Gens im Herzmuskel

Im nächsten Schritt sollte die DSG2-Mutation im Herzgewebe nachgewiesen werden. Wie zuvor beschrieben (1.10.), wurde für diese Arbeit zur gewebespezifisch induzierten Deletion des „gefloxten“ DSG2-Allels die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines herzmuskelspezifischen Promotors (α -MHC) als Effektor eingesetzt. Ihre Expression war somit streng auf den Herzmuskel beschränkt. Das „gefloxte“ DSG2-Allel konnte in diesem Stamm (konditionale Mutanten) also zeitlich bestimmt und gewebespezifisch rekombiniert werden. Eine erfolgreiche Rekombination des DSG2-Lokus konnte deshalb nicht wie bei den konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutanten über DNA aus Schwanzbiopsien nachgewiesen werden. Diese musste direkt über DNA aus Herzmuskelgewebe erfolgen. Dabei kam die PCR auf erfolgreiche „Rekombination des DSG2-Lokus“ zur Anwendung, die in 3.1.1. genauer beschrieben ist. Transgene Tiere, die homozygote Träger der konditional, gewebespezifischen DSG2-Mutation waren, wurden getötet und Herzgewebe, Dünndarm, Dickdarm, Leber und Hautgewebe zur DNA-Isolierung entnommen. Zusätzlich zu den Geweben der konditionalen Mutanten wurden auch die entsprechenden Gewebe der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Tiere auf Rekombination untersucht. Weiterhin wurden Gewebe einer Kontrollmaus untersucht, die Träger der konditional gewebespezifischen Mutation war.

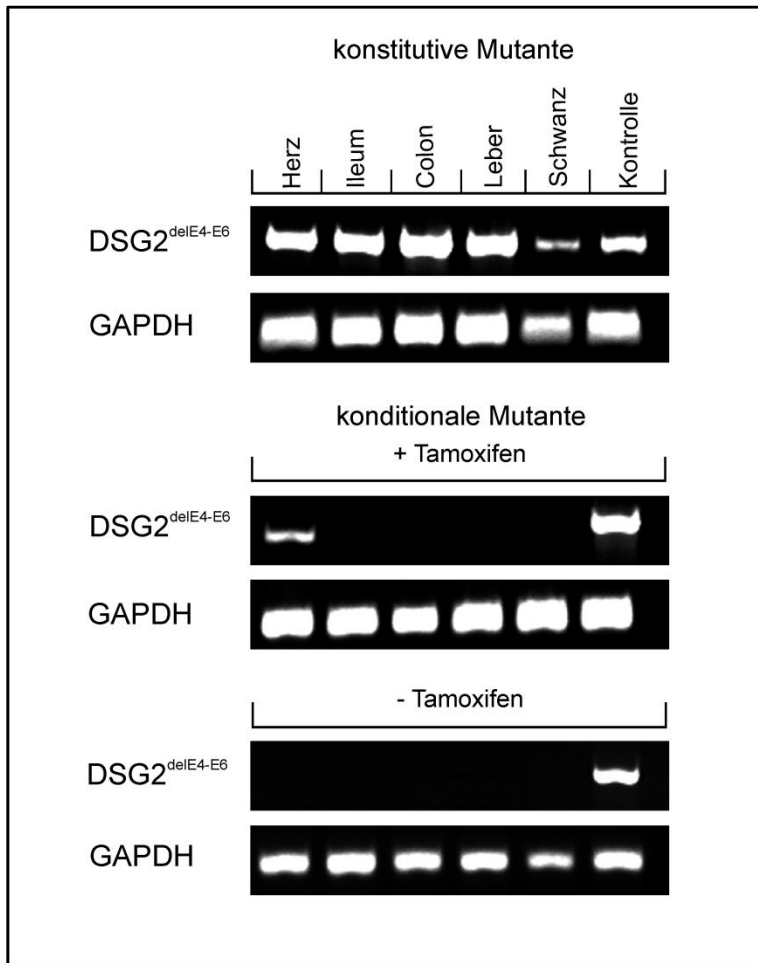


Abbildung 15: PCR-Analyse der zelltypspezifische Rekombination des DSG2-Lokus: Es wurden Gewebeproben aus Herz, Dünndarm, Dickdarm, Leber und Schwanz aus einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante, einer mittels Tamoxifen über 5 aufeinanderfolgende Tage induzierten konditionalen Mutante und einer nicht-induzierten konditionalen Mutante entnommen und mittels PCR-Analyse auf eine erfolgreiche Rekombination des DSG2-Allels (DSG2^{delE4-E6}) überprüft. Wie zu erwarten, kann bei der DSG2^{delE4-E6}-Mutante in allen Geweben ein PCR-Produkt des rekombinierten DSG2-Lokus nachgewiesen werden. Bei der konditionalen Mutante kann lediglich ein PCR-Produkt des rekombinierten Lokus in der DNA-Probe des Herzens detektiert werden. Die DNA-Proben aus der Kontrollmaus zeigt in keinem Fall eine Rekombination des DSG2-Allels. Für die Kontrolle der Intaktheit der DNA dient der Nachweis von GAPDH.

das induzierbare Rekombinationssystem funktionstüchtig war, als auch dass die homozygoten konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten Träger von zelltypspezifischen, rekombinierten DSG2-Allelen waren.

Diese Maus wurde 5 aufeinanderfolgende Tage mit Öl behandelt, sodass die Rekombination des DSG2-Lokus nicht ausgelöst wurde. Wie zu erwarten, bildete sich bei der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante ein PCR-Produkt in der PCR-Analyse auf „Rekombination des DSG2-Lokus“ für alle Gewebe (Abbildung 15). Die DNA-Proben der konditionalen Mutanten zeigten erwartungsgemäß exklusiv im Herzmuskelgewebe eine erfolgreiche Rekombination

(Abbildung 15). Die restlichen Gewebe der konditionalen Mutanten und die Gewebe der Kontrollmutante wiesen keine Banden für den rekombinierten DSG2-Lokus auf. Als Kontrolle der isolierten DNA wurde für jede Probe das GAPDH-Gen nachgewiesen. Diese PCR-Analysen zeigten, dass sowohl

3.4. Nachweis der rekombinierten DSG2-mRNA

Zur weiteren Charakterisierung der DSG2-Rekombination im Herzen sollte die durch die Mutation des DSG2-Gens entstehende, verkürzte mRNA nachgewiesen werden. Untersucht wurden sowohl Herzgewebe einer homozygoten konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante, als auch die Herzgewebe von konditionalen Mutanten (homozygote DSG2^{loxP}-Tiere), die nach dem zuvor beschriebenen Protokoll (3.1.) mit Tamoxifen behandelt wurden. Aus den Herzgeweben der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und den über 5 Tage und 5 Wochen behandelten konditionalen Mutanten wurde Gesamt-RNA extrahiert und in einem RT-PCR-Programm mit oligo-dT₍₂₃₎-Primern in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matritze für eine PCR-Analyse mit spezifischen Primern, welche die zu deletierenden drei Exone 4-6 flankierten. Je nachdem, welche mRNA gebildet wurde, bildeten sich unterschiedlich große PCR-Produkte. Der rekombinierten mRNA fehlten drei Exone, wodurch das PCR-Produkt kleiner ausfiel (211 bp). Die wildtypische mRNA bildete entsprechend der vorhandenen Exone 4-6 ein deutlich größeres PCR-Produkt (685 bp) (Abbildung 16). Als Mengenkontrolle der mRNA wurde eine PCR-Analyse auf das GAPDH-Gen durchgeführt. Erwartungsgemäß entstand für die Negativkontrolle ein PCR-Produkt für die wildtypische mRNA (685 bp). Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante. Nach 5 Tagen Tamoxifenbehandlung bildete sich bereits ein deutliches PCR-Produkt für die rekombinierte mRNA bei einer Größe von 211 Basenpaaren. Zusätzlich konnte eine schwache Bande bei der wildtypischen mRNA nachgewiesen werden. Die Rekombination des DSG2-Lokus erreichte bereits nach 5 Tagen Induktion eine hohe Effizienz. Nach 5 Wochen Induktion war kein wildtypisches PCR-Produkt mehr nachweisbar und es bildete sich nur noch eine Bande für die rekombinierte mRNA. Auch in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}- Mutante entstand keine wildtypische Bande mehr (Abbildung 16).

Für beide Mutanten konnte mittels PCR-Analyse eine erfolgreiche Rekombination des DSG2-Lokus (3.3) und die Synthese einer verkürzten, mutierten mRNA nachgewiesen werden.

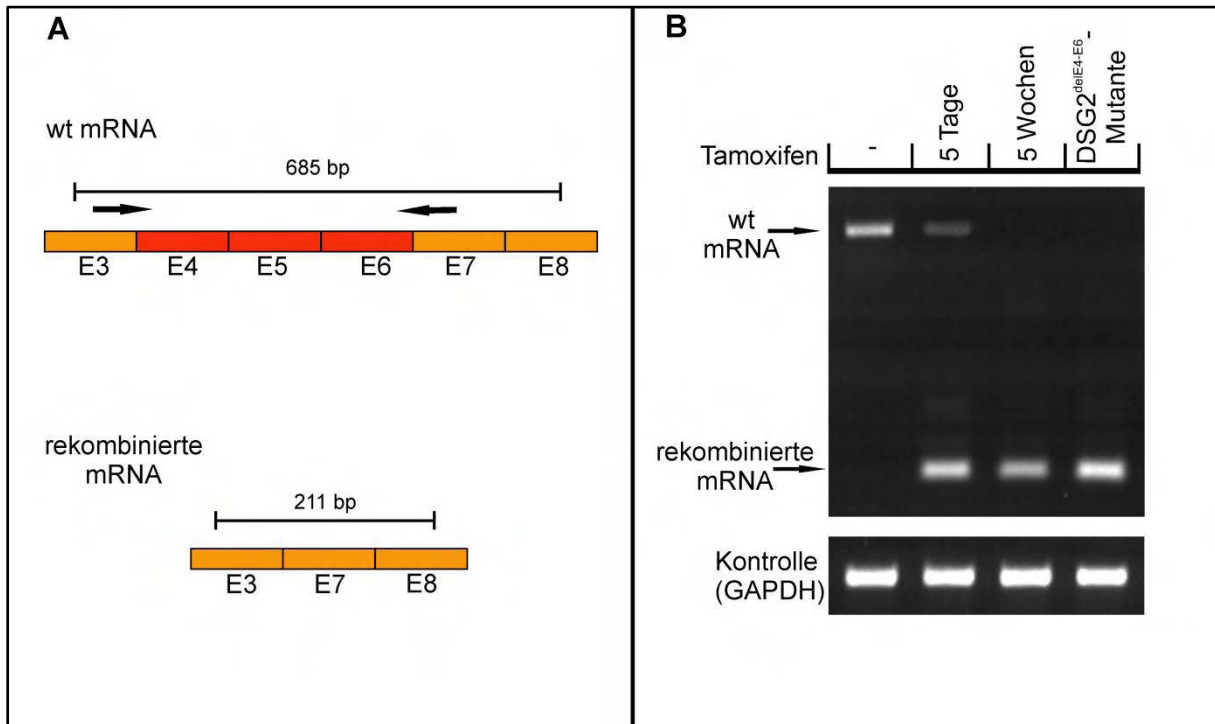


Abbildung 16: RT-PCR-Analyse zur Detektion der rekombinierten mRNA: Die rekombinierte mRNA wurde mittels RT-PCR in folgenden Tieren nachgewiesen: in einer homozygoten konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante, die in allen Geweben den rekombinierten DSG2-Lokus trägt und in über 5 Tagen und 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten (homozygote DSG2^{loxP}-Tiere). Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte (Injektion von Öl) konditionale Mutante. Nachdem Töten der Tiere wurden Gewebeproben vom Herzen der Tiere entnommen. Aus diesen Proben wurde Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matritze für sequenzspezifische Primer, wodurch in einer PCR-Analyse das wildtypische und das kleinere rekombinierte PCR-Produkt detektiert werden konnte. **(A)** Nach der Rekombination wird ein deutlich kleineres RNA-Fragment gebildet, dem die drei Exone 4-6 fehlen **(B)** Entsprechend bilden sich zwei unterschiedlich große PCR-Produkte: im Fall der Negativkontrolle entsteht eine Bande für die wildtypische RNA (685 bp) und im Fall der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und der induzierten Rekombination des DSG2-Lokus lässt sich lediglich noch eine Bande für die verkürzte mRNA nachweisen (211 bp).

3.5. Untersuchung des rekombinierten Dsg2-Proteins

Nachdem die Analyse der mRNA mittels RT-PCR zweifelsfrei gezeigt hat, dass in beiden mutierten Stämmen eine rekombinierte, verkürzte mRNA synthetisiert wurde, sollte nun auch das entstehende Desmoglein 2-Protein analysiert werden. Diese Untersuchung wurde mit Western Blot-Analysen aus Gesamtproteinextrakten aus Herzgeweben von über 5 Tagen bzw. 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten und konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten durchgeführt.

Die Proteinmenge wurde nach Bradford bestimmt und die Proben nach dem Blotten mit einem α -Desmoglein 2-Antikörper und einem α -Aktin-Antikörper, als Ladekontrolle inkubiert.

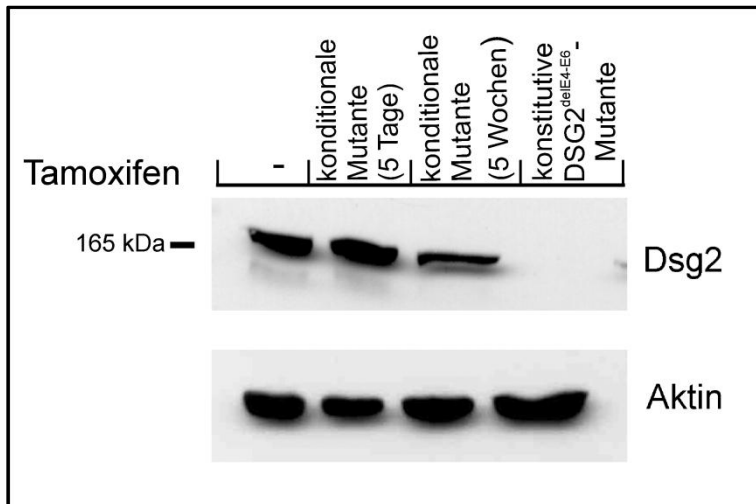


Abbildung 17: Western-Blot-Analyse des rekombinierten Dsg2-Proteins: Es wurden Proteinextrakte aus den Herzgeweben einer über 5 Tage bzw. 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante gewonnen. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte (mit Öl behandelte) konditionale Mutante. Die Proben wurden mit einem Dsg2-Antikörper und einem α -Aktin-Antikörper, als Ladekontrolle inkubiert. Im Anschluss wurden die Intensität und die Größe der entstandenen Banden verglichen. Es fällt auf, dass die Intensität der Bande nach einer Induktion über 5 Wochen deutlich abnimmt. In der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante ist kein Dsg2-Protein mehr nachweisbar

Im Anschluss wurden die Größen und die Intensität der entstandenen Banden verglichen. Der α -Desmoglein 2-Antikörper markiert eine Bande von 165 kDa, was dem apparenten Molekulargewicht von Dsg2 entspricht. Die gleichmäßige Dicke der α -Aktin-Banden ließ auf eine einheitliche Proteinmenge in allen Proben schließen. Die nicht-induzierten konditionalen Mutante (Kontrolle) und die über 5 Tage induzierte konditionale Mutante zeigten eine Bande gleicher Dicke.

Vergleich man die Banden der beiden anderen Mutanten fiel auf, dass die Intensität der Bande nach 5 Wochen Induktion deutlich niedriger war, als die entsprechende Bande für α -Aktin (Abbildung 17). Da die Kontrolle durch α -Aktin belegt, dass die schmalere Bandenbreite nicht durch einen geringeren Anteil an Gesamtprotein in der Probe zustande gekommen sein kann, musste davon ausgegangen werden, dass der Anteil an wildtypischen Desmoglein 2 innerhalb von 5 Wochen abnahm. Diese Annahme wurde gestützt durch die Tatsache, dass in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante kein Desmoglein 2 mehr nachweisbar war. Dieses Experiment zeigte, dass es durch die Rekombination des DSG2-Lokus und nach der Synthese der rekombinierten mRNA zu einem Abfall der Desmoglein 2-Konzentration kam. Man konnte zudem kein verkürztes Dsg2-Protein nachweisen

3.6. Makroskopische Veränderungen

Die transgenen Tiere wurden laufend beobachtet. Dabei bestand besondere Aufmerksamkeit gegenüber den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten, da diese Mäuse die DSG2-Mutation bereits seit Beginn der embryonalen Herzentwicklung trugen. In der Tat konnte man bei

diesen Tieren bereits nach 2 Monaten eine erhöhte Atemfrequenz feststellen. In einem Fall konnte ein plötzlicher Bewusstseinsverlust festgestellt werden. Bei einer Kontrolluntersuchung der Tiere fiel eine Maus auf, die regungslos im Käfig lag. Nach kurzer Zeit war dieses Tier wieder ansprechbar und zeigte keine Auffälligkeiten mehr. Der plötzliche Bewusstseinsverlust (Synkope) kommt durch einen Sauerstoffmangel im Gehirn zustande und wird bei ARVC-Patienten durch die unzureichende Herzleistung und der damit verbundenen mangelhaften Versorgung des Gehirns mit Blut hervorgerufen. Bei den konditionalen Mutanten war die Interpretation weitaus schwieriger. Da diesen Tieren über einen längeren Zeitraum Tamoxifen in die Bauchhöhle injiziert worden war, konnten deren Veränderungen im Allgemeinzustand, nicht zwingend den entstehenden Veränderungen im Herzen zugeschrieben werden. Sämtliche getötete oder gestorbene Tiere wurden einer Obduktion unterzogen. Dabei standen zum Einen die möglichen Veränderungen des Herzens und zum Anderen, die daraus resultierenden Veränderungen der anderen Organe oder Körperhöhlen im Vordergrund. Besonderer Aufmerksamkeit unterlagen Veränderungen, die Parallelen zum pathologischen Bild der Erkrankung ARVC ziehen ließen. Zu erwarten waren bindegewebige Durchsetzungen der Herzwände und dilatierte Kammern. Durch den Rückstau in den Körper- oder Lungenkreislauf konnten Stauungen in Lunge, Leber und Darm, Aszites oder ein Thoraxerguß erwartet werden. In der Tat zeigten sich extreme, makroskopisch sichtbare Veränderungen der Herzen.

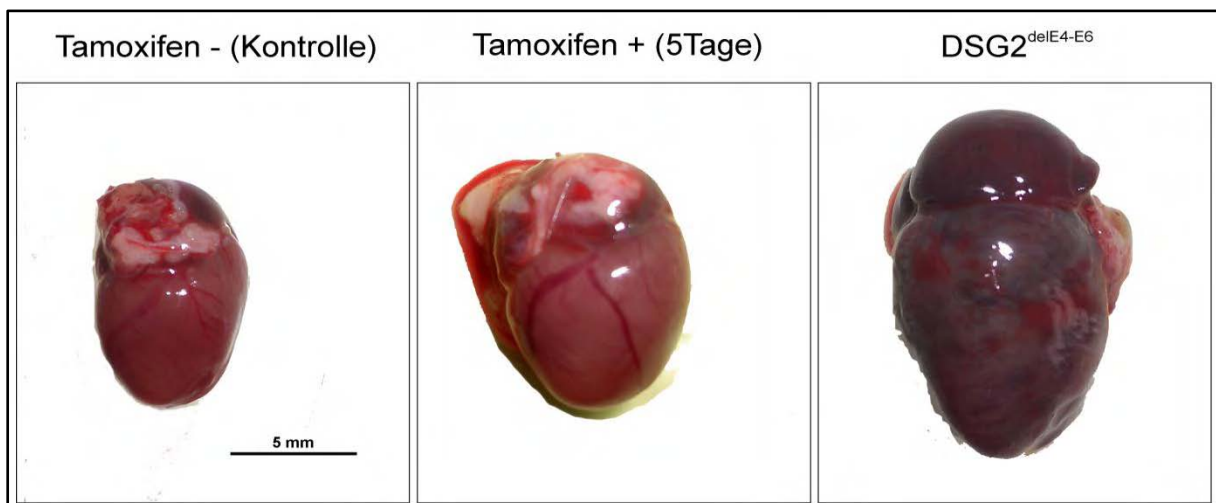


Abbildung 18: Makroskopische Darstellung der veränderten Herzen: Die Herzen einer, mit Öl behandelten, nicht-induzierten konditionalen Mutante, einer über 5 aufeinanderfolgende Tage induzierten konditionalen Mutante und einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante wurden bei der Obduktion entnommen und fotografiert. In dieser vergleichenden Darstellung kann man sowohl die deutliche Größenzunahme der Herzen insgesamt, als auch die starke Vergrößerung der Herzhöhlen erkennen.

Besonders stark ausgeprägt waren diese Veränderungen in den Herzen der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutanten. Bedeutend war die deutliche Vergrößerung der Herzen (Abbildung 18). Die Herzohren und die Vorhöfe waren erweitert. Auffällig war auch, die oftmals

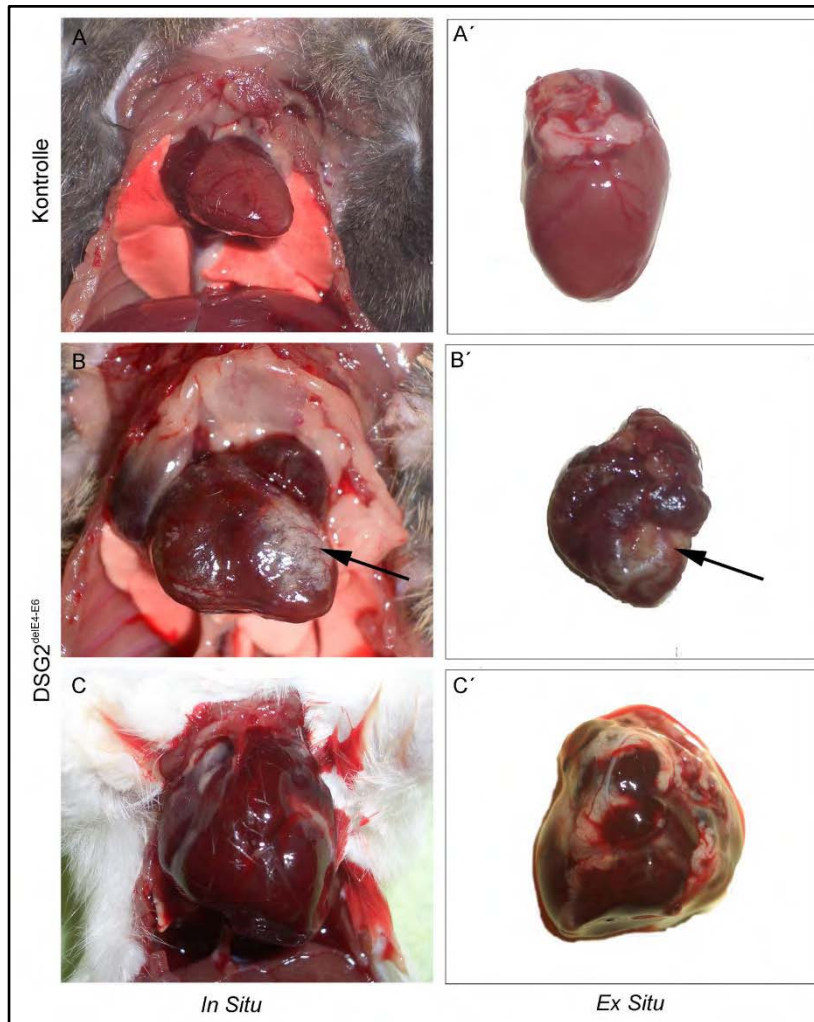


Abbildung 19: Darstellung der konstitutiv mutierten Herzen

In Situ und Ex Situ: Dargestellt sind die Herzen von konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutanten. Als Kontrolle diente eine wildtypische Maus. (A) *In Situ*-Aufnahme eines wildtypischen Herzens. Die Lunge ist deutlich zu erkennen. Die Herzspitze ragt nach links gerichtet in den Brustraum. Die Herzohren liegen eng auf beiden Seiten den entsprechenden Vorhöfen an. Die Oberfläche des Herzens ist glatt und glänzend. (A') *Ex Situ*-Aufnahme des Herzens aus A. (B) *In Situ*-Aufnahme einer konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante. Deutlich zu erkennen sind die weißen Strukturen auf dem linken Ventrikel (Pfeile), einer Bindegewebedurchsetzung der Ventrikelwand. Weiterhin ist eine Vergrößerung des gesamten Herzens erkennbar. Beide Ventrikel haben ihre Form verloren und erscheinen ausgebeult. Auch beide Herzohren sind deutlich vergrößert. (B') *Ex Situ*-Aufnahme einer konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante. Beschreibung: siehe B (C) Der Herzbeutel dieser Maus ist gefüllt mit koaguliertem Blut. Diese Maus starb an einer Herztamponade durch einen Riss in der rechten Ventrikelwand. (C') *Ex Situ*-Aufnahme des Herzens aus C.

bläuliche Färbung der veränderten Herzen. Zusätzlich zu den vergrößerten Herzen und den Stauungszuständen zeigten sich weitere Veränderungen, die einen Vergleich mit den pathologischen Ausprägungen der Erkrankung ARVC zuließen. Auf jedem Herzen der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutanten zeigten sich weißlich-gelbliche Auflagerungen. Schon ohne diese Veränderungen histologisch untersucht zu haben, konnte

vermutet werden, dass es sich um eine Durchsetzung der Herzkammermuskulatur mit Bindegewebe handelte (Abbildung 19). In einem Fall starb eine Maus am plötzlichen Herztod, konnte jedoch rechtzeitig obduziert und auf ihre genaue Todesursache hin

untersucht werden. Bei Eröffnung der Brusthöhle fiel ein enorm vergrößertes, dunkelrot

verfärbtes Herz auf. Bei Herausnahme und Durchtrennung des Herzens konnte man den mit Blut gefüllten Herzbeutel erkennen (Abbildung 19). Nach einer histologischen Untersuchung wurde der Verdacht bestätigt, dass diese Maus an einer Herztamponade, durch Riss im rechten Ventrikel gestorben war. Die Wand des rechten Ventrikels bestand nur noch aus Bindegewebe, das der hohen mechanischen Belastung nicht standhalten konnte (Abbildung 20). Erstaunlicherweise zeigten sich kaum Auswirkungen dieser Herzveränderungen auf die übrigen Körperfunktionen der erkrankten Mäuse. Lediglich eine Lungenstauung konnte in einzelnen Fällen beobachtet werden. Stauungszustände im großen Körperkreislauf, sowie in Organen, wie Leber und Darm zeigten sich makroskopisch nicht. Auch diese Ausprägung stimmte mit der Klinik der Erkrankung ARVC überein. Die konditionalen Mutanten zeigten makroskopisch kaum Auffälligkeiten. Lediglich eine leichte Vergrößerung des Herzens (Abbildung 19) und eine blässere Färbung konnte nachgewiesen werden. Die blässere Verfärbung könnte man durch die geringere Sauerstoffzufuhr und die verminderte Durchblutung erklären, da bei diesen Herzen noch keine kompensatorischen Maßnahmen zum Tragen kamen.

3.7. Histologie

3.7.1. Allgemeine Veränderungen

Nach eingehender Obduktion wurden die Herzen der transgenen Mäuse für die Histologie vorbereitet. Die Gewebe wurden in Paraformaldehydlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den eingebetteten Herzen wurden Querschnitte angefertigt, um die Größe der beiden Herzkammern genau beurteilen zu können. Die Schnitte wurden daraufhin zur Übersicht in Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Um die Durchdringung des Herzmuskelgewebes mit Bindegewebe besser darzustellen, wurde eine weitere Spezialfärbung (AZAN-Färbung) angewendet. Beurteilt wurden folgende Herzen: als Kontrolle dienten nicht-induzierte, mit Öl behandelte konditionale Mutanten, deren Rekombination nicht ausgelöst wurde. Weiterhin wurden Herzen von über 5 Tagen, bzw. 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten und konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten untersucht.

In den histologischen Übersichtsaufnahmen fiel auf, dass es bereits nach einer Woche Tamoxifenbehandlung zu einer deutlichen Dilatation des rechten Ventrikels kam (Abbildung 20). Auch nach 5 Wochen Induktion ließ sich keine Steigerung dieser Veränderung feststellen. Allerdings waren die rechten Herzkammern der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-

Mutanten in weitaus stärkerem Maß dilatiert und „ausgebeult“ (Abbildung 20). Somit konnte man davon ausgehen, dass es sich bei der makroskopisch erfassten Veränderung, um eine Dilatation handelte, die hauptsächlich die rechte Herzkammer betraf. Diese Tatsache zeigte weitere Parallelen zur Erkrankung ARVC.

Bei Betrachtung der Schnitte in weiteren Vergrößerungen konnte man eine der Ursachen der Dilatation erkennen. Das gesamte Herzmuskelgewebe wurde durch Bindegewebe ersetzt (Abbildung 20). Diese Veränderungen waren bereits nach 5 Tagen Tamoxifenbehandlung zu erkennen und steigerten sich nach 5 Wochen Rekombination. Während nach 5 Wochen Induktion eine flächige Durchdringung mit Bindegewebe erfolgt war, waren die Bereiche in den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten fleckig und auf einzelne Stellen begrenzt. In diesen Arealen war der Ersatz durch Bindegewebe allerdings soweit fortgeschritten, dass auch zwischen den Kollagenfasern keine Muskelzellen mehr zu finden waren.

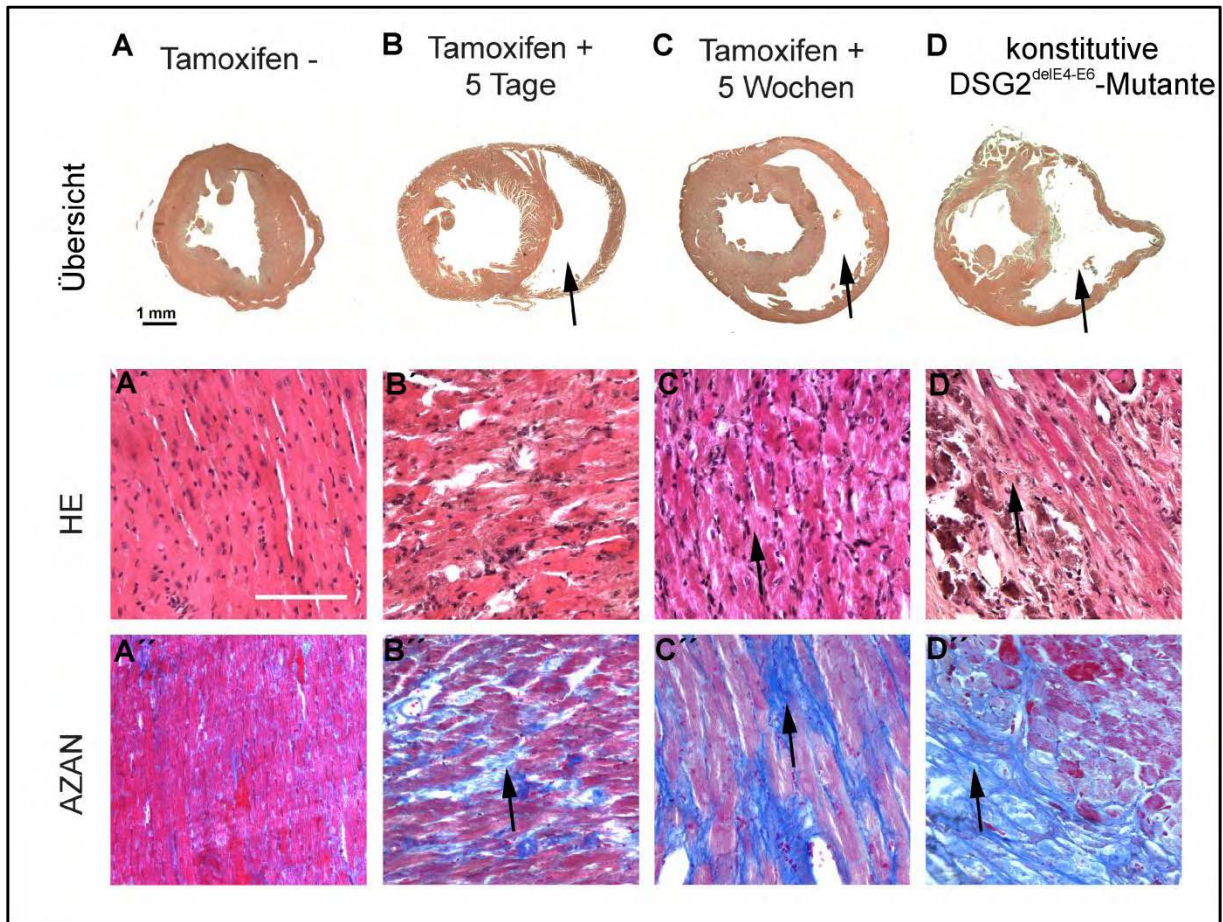


Abbildung 20: Übersicht über die histologischen Veränderungen der transgenen Mäuseherzen: Gezeigt werden die Herzen von über 5 Tagen bzw. 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten und einer konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante in einer Übersichtsaufnahme (HE-Färbung) und zwei unterschiedlichen Detailaufnahmen (AZAN- und HE-Färbung). Als Kontrolle diente ein nicht-induziertes, mit Öl behandeltes Tier (Tamoxifen -). Bemerkenswert sind die deutlich erweiterten rechten Ventrikel in den Übersichtsaufnahmen bei allen transgenen Tieren (Pfeile) (B-D). In der HE-gefärbten Detailaufnahme sind bei der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante extreme Bindegewebszubildungen zu erkennen (D'), die in der AZAN-Färbung (D'') blau dargestellt sind (Pfeile). Die Veränderungen in den konditionalen Mutanten beginnen nach 5 Tagen Tamoxifenbehandlung mit einem Verlust der Zellgrenzen und einem „Auseinanderreißen“ der Zellen (B'). Der entstehende „Hohlraum“ wird mit Bindegewebe ausgefüllt (Pfeil in der AZAN-Färbung nach 5 Tagen Tamoxifen +). Nach 5 Wochen Induktion ist der Ersatz des Herzmuskelgewebes durch Bindegewebe deutlich fortgeschritten (C'). Die in der AZAN-Färbung (C'') rot dargestellten Herzmuskelzellen erscheinen wie Schollen im blaugefärbten Bindegewebe (Pfeile). Größenbalken: 100 μm

Die Veränderungen begannen nach 5 Tagen Induktion mit einem Verlust der Herzmuskelzellgrenzen. Es entstand der Eindruck die Zellen würden „auseinanderdriften“. Nach kurzer Zeit zeigte sich ein Hohlraum an den Stellen, wo die Zellen den Kontakt zueinander verloren hatten. Dieser Raum wurde im weiteren Zeitverlauf mit Bindegewebe ersetzt. In den konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutanten sah man große untergehende Zellareale, die bereits umrandet waren von ausdifferenziertem Bindegewebe.

3.7.2. Histologische Veränderungen der induzierten konditionalen Mutanten

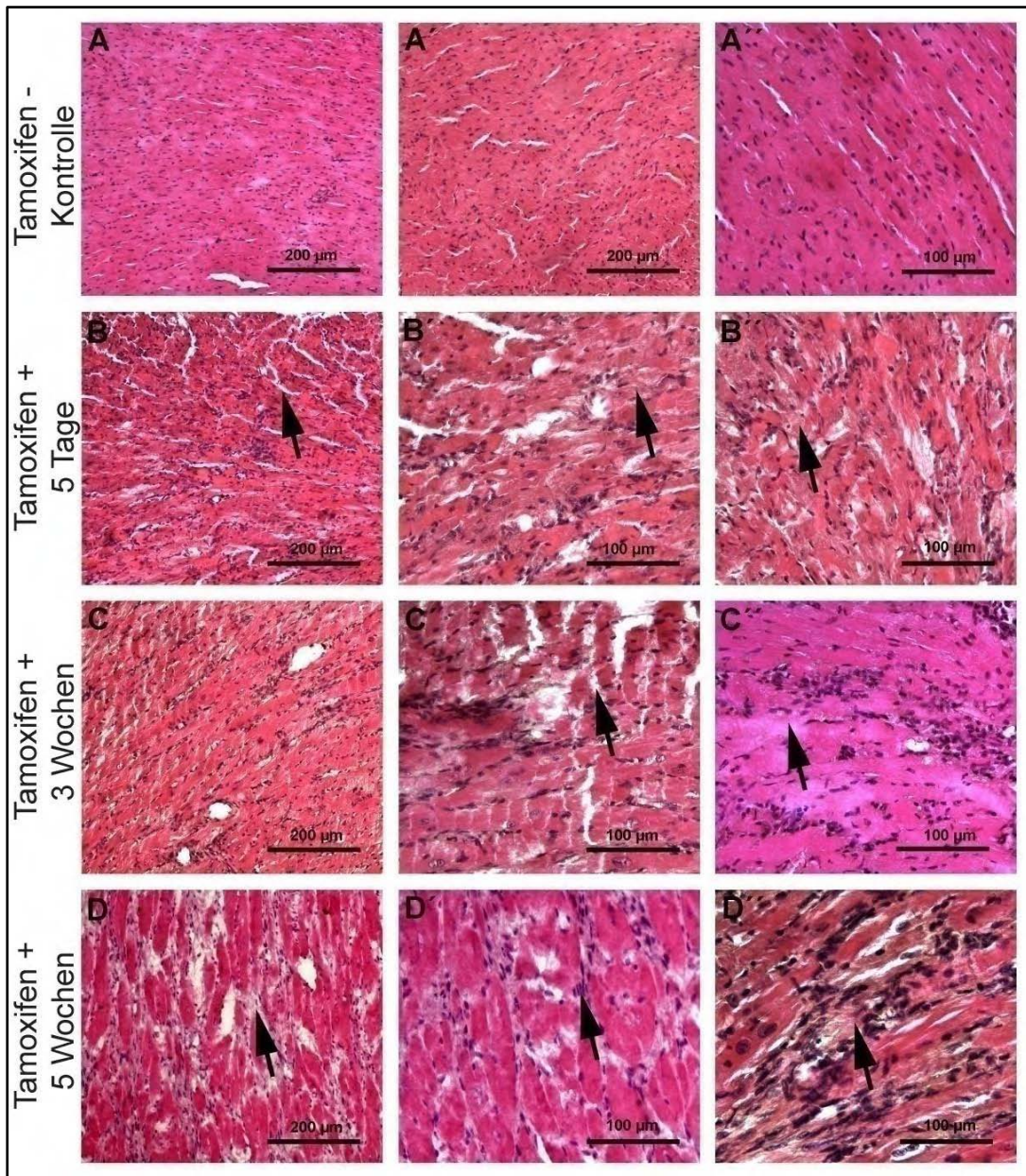


Abbildung 21: Histologische Veränderungen der konditionalen Mutanten: Gezeigt werden die veränderten Herzen von über 5 Tagen bzw. 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten. Als Kontrolle diente ein nicht-induziertes Tier (Tamoxifen -). (A-A') Kontrolle in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen; die Zellen liegen dicht nebeneinander und es befindet sich kaum Bindegewebe zwischen den Zellen. Die Kerne liegen zentral geordnet in den Zellen (B) Übersichtsaufnahme einer 5 Tage induzierten konditionalen Mutante. Die Zellen „reißen“ auseinander (Pfeil), es bilden sich „Kernhaufen“ überall im Gewebe und erste Bindegewebszubildungen sind zu erkennen (aufgehellte Bereiche) (B'-B'). Die Detailaufnahmen einer 5 Tage induzierten Mutante zeigen auseinandergerissene Zellen und Bindegewebszubildungen (Pfeil) (C-C') Bilder einer über 3 Wochen induzierten konditionalen Mutante (C) Die Zellen sind noch deutlicher „zerrissen“ (Pfeil) (C') Die Zellgrenzen gehen verloren (Pfeil) (D-D') Aufnahmen einer über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante, hier sind besonders die extremen Bindegewebszubildungen auffällig (Pfeile) (D') In der Detailaufnahme sieht man wieder die „Kernanhäufungen“ (Pfeile) und den Ersatz des Herzmuskelgewebes durch Bindegewebe

Um den zeitlichen Verlauf der Ausprägung der histologischen Veränderungen optimal beurteilen zu können, bot sich eine gestaffelte Behandlungsdauer mit Tamoxifen an. Die erste Gruppe wurde 5 Tage induziert. Die zweite Gruppe wurde über 3 Wochen mit Tamoxifen behandelt und bei der dritten Gruppe wurde die Behandlung 5 Wochen fortgeführt.

Wie schon in 3.7.1. kurz erwähnt zeigten sich die folgenden Hauptveränderungen: die Muskelzellen verloren bereits nach 5 Tagen Induktion den Kontakt zueinander und „drifteten auseinander“ (Abbildung 21). Es bestand die Möglichkeit, dass das „Auseinanderreißen“ der Zellen im Zuge der Behandlung oder Einbettung passierte und nichts mit der Pathogenese zu tun hatte. Allerdings konnte in den Kontrollen, die mit den gleichen Methoden behandelt wurden keine dieser Veränderungen gefunden werden. In großen Arealen waren keine Zellgrenzen mehr auszumachen und es bildeten sich „Kernhaufen“, die in den histologischen Bildern nicht genauer definiert werden konnten (Abbildung 21). Im weiteren Verlauf (nach 3-5 Wochen) bildete sich Bindegewebe zwischen den Herzmuskelzellen, um den entstandenen Raum auszufüllen (Abbildung 21).

3.7.3. Histologische Veränderungen der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten

Nachdem die histologische Betrachtung der konditionalen Mutanten pathologische Veränderungen gezeigt hatte, konnte man davon ausgehen, dass die Veränderungen in den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten viel ausgeprägter sein würden. In der Tat zeigten sich Bilder, die auf eine eventuelle Pathogenese schließen ließen.

Generell zeigten sich in allen konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten folgende Veränderungen: Es kam zu enormen Bindegewebsbildungen, die beide Ventrikelwände durchdrangen. Gleichzeitig gab es Areale mit untergehenden Herzmuskelzellen, die von differenziertem Bindegewebe umgeben waren und schollig zerfielen (Abbildung 22). Innerhalb dieser Areale waren weiterhin viele Fibroblastenkerne zu finden, die für die Ausdifferenzierung des Bindegewebes nötig waren.

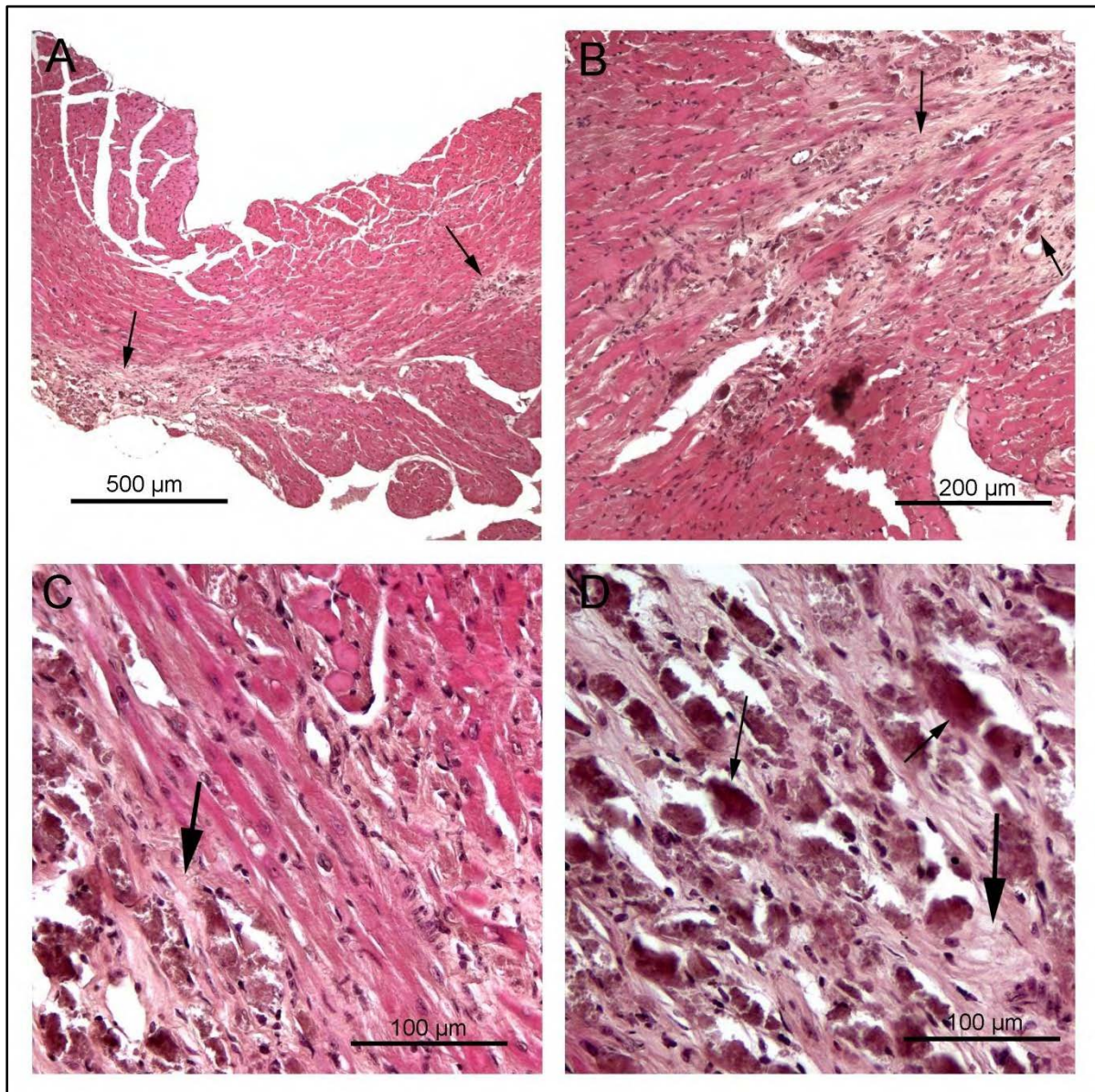


Abbildung 22: Übersicht über die histologischen Veränderungen der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten: Gezeigt werden HE-Schnitte der Herzen von konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten. (A) Diese Übersichtsaufnahme zeigt den Ersatz des Herzmuskelgewebes durch Bindegewebe, welches uneinheitlich in die Ventrikelwand eingelagert ist (Pfeile). (B) Hier wird eine Vergrößerung aus A gezeigt, in der das Bindegewebe noch deutlicher von dem intakten Muskelgewebe unterscheidbar ist (Pfeile). (C) Gezeigt wird eine noch stärker vergrößerte Aufnahme der betroffenen Bereiche. Zusätzlich zum Bindegewebe sind rot-braune, schollenartige „Plaques“ zu erkennen (Pfeil), bei denen es sich um die untergehenden Herzmuskelzellen handelt. (D) Diese Detailaufnahme zeigt die, in Bindegewebe eingelagerten (großer Pfeil), untergehenden Herzmuskelzellen (kleiner Pfeil).

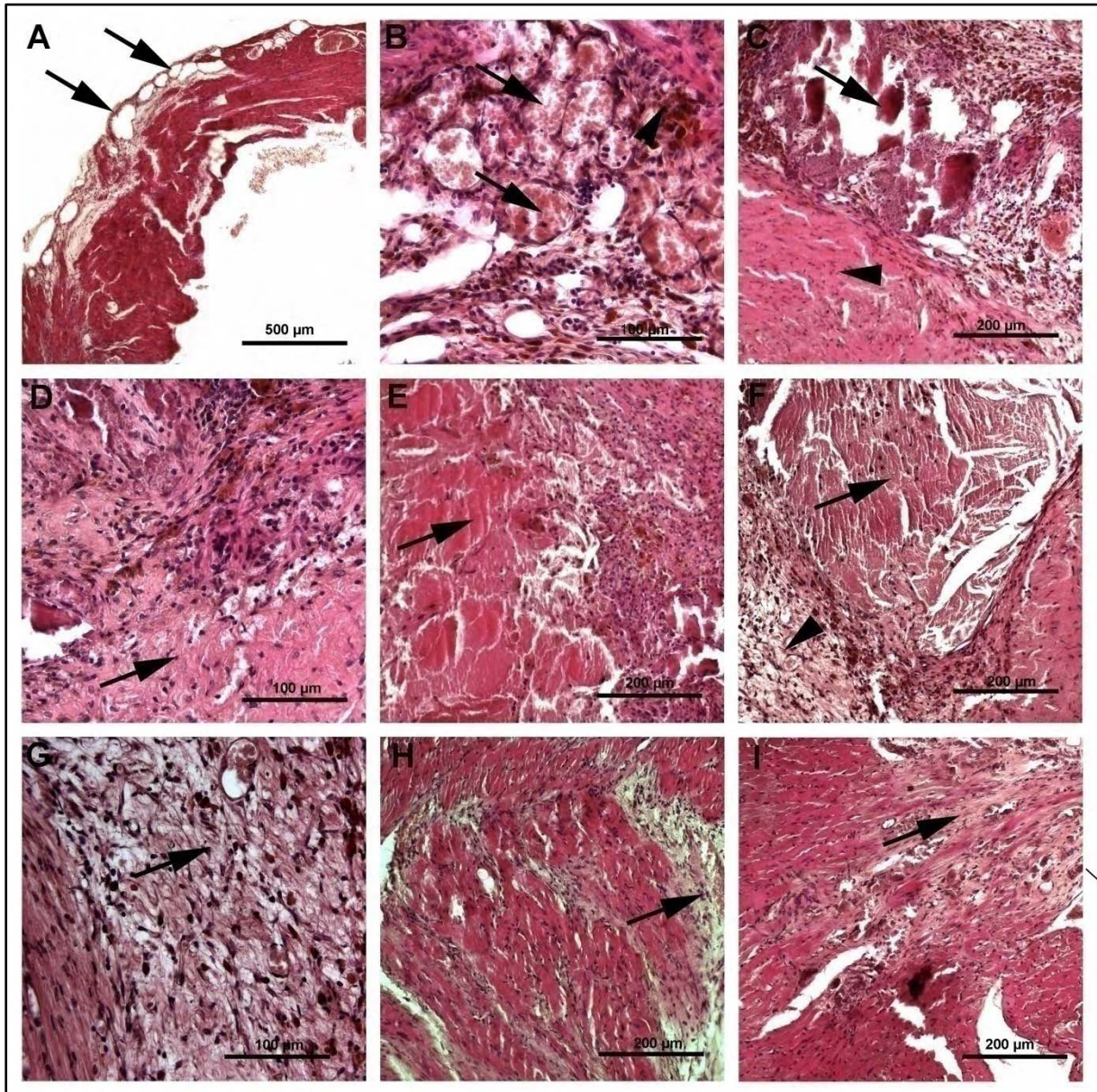


Abbildung 23: Histologische Veränderungen der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}- Mutanten (HE-Färbung): (A) Übersichtsaufnahme der Ventrikelwand mit Bindegewebszubildungen. Auffällig sind die deutlich hervorgetretenen Blutgefäße in der Wand (Pfeile). (B) Vergrößerte Aufnahme der Blutgefäße (große Pfeile); weiterhin schmutzig-braune Ablagerungen im Gewebe, die als Hämosiderin bezeichnet werden und durch den Myoglobinabbau zustande kommen (Pfeilkopf). (C-D) Hier sind wieder der Verlust der Zellgrenzen (Pfeilkopf) und der schollige Zerfall der Herzmuskelzellen (Pfeil) zu erkennen. (E) Der Hohlraum, der durch den scholligen Zerfall der Herzmuskelzellen entsteht, wird in einem ersten Schritt mit Fibrin (Pfeil) ausgefüllt, welches sich dann in mehreren Schritten zu Bindegewebe organisiert (F-I) (F) Hier sieht man in der Mitte noch, den mit Fibrin aufgefüllten Hohlraum (Pfeil) und am Rand bereits die erste, weitmaschige Bindegewebsorganisation (Pfeilkopf) (G) Detailaufnahme der ersten weitmaschigen Bindegewebsorganisation mit eingelagerten Fibroblastenkernen. (H-I) In diesen Aufnahmen wird die fortgeschrittene Metaplasie des Herzmuskelgewebes in weniger differenziertes Bindegewebe (Pfeile) dargestellt.

Eine Möglichkeit, den Verlauf dieser pathologischen Ausprägung der DSG2-Mutation nachzuvollziehen, wird in Abbildung 23 dargestellt.

Das vermehrte Auftreten von erweiterten Blutgefäßen ließ auf die peripheren Stauungszustände und die erschwerte Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr schließen. In den histologischen Bildern zeigten sich insbesondere in der Peripherie der Ventrikelwände vermehrt vergrößerte Gefäße. Durch den Verlust der Verbindung zueinander (Verlust der Zellgrenzen, „Auseinanderreißen“) wurde die Versorgung der einzelnen Herzmuskelzellen, durch die vorhandenen Gefäße nicht mehr ausreichend gedeckt. Um weiterhin die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der veränderten Herzmuskelzellen aufrechtzuerhalten und die Funktionalität sowie die Kontraktilität des Herzens zu gewährleisten, müssten größere Blutmengen in das Gewebe transportiert werden. Diese Situation und auch der vermehrte Transport von Abbauprodukten (Myoglobinabbau) führten zu einem erhöhten Bedarf an Blut. Entsprechend des Bedarfs kam es zu einer stärkeren Gefäßeinsprossung. Um diese Gefäße herum zeigten sich enorme „Kernanhäufungen“, die teilweise aus Fibroblastenkernen bestanden. Darüber hinaus zeigten sich kleine schmutzig-braune Ablagerungen in Bereichen des Zelluntergangs. Bei diesen braunen Plaques handelte es sich um Hämosiderin, das im Rahmen des Myoglobinabbaus gebildet wurde und durch die Aufnahme von Makrophagen abgebaut wurde. Entzündungszellen waren kaum vorhanden. Neben den zerfallenden Herzmuskelzellen, die an den braun-roten schollenartigen Plaques erkennbar waren, gab es Areale, in denen keine Zellgrenzen mehr gefunden werden konnten. Die Hohlräume, die durch den schollenartigen Zerfall der Herzmuskelzellen entstanden, wurden in einem ersten Schritt mit Fibrin ausgefüllt. In mehreren weiteren Schritten kam es zu einer bindegewebigen Organisation des Defektes. Zuerst bildete sich ein lockeres Netz aus Bindegewebe und Fibroblastenkernen, welches sich, auch im Zuge der starken mechanischen Belastung weiter organisierte (Abbildung 23).

3.8. Apoptose

Nach Betrachtung der histologischen Bilder fiel auf, dass es keine Anzeichen von Entzündungen gab. Es zeigten sich nur vereinzelt Entzündungszellen, bei denen es sich um Monozyten oder Makrophagen handelte, die rekrutiert wurden, um die entstehenden Zelltrümmer und Stoffwechselprodukte abzubauen. Eine Nekrose oder ein Infarkt, die durch die sinkende Nährstoff- und Sauerstoffversorgung entstanden sein könnten, waren also ausgeschlossen, da es in diesem Fall zu enormen Entzündungserscheinungen kommen würde und man histologisch Nekroseherde oder eine typische Infarktnarbe finden müsste. Es schien

komplexere Gründe für den Untergang der Herzmuskelzellen zu geben. Eine Möglichkeit den Untergang der Zellen, ohne Entzündungsanzeichen zu erklären, war der programmierte Zelltod (Apoptose). Die Rolle der Apoptose in der Entwicklung von Herzerkrankungen, insbesondere von dilatativen Kardiomyopathien wurde in der Vergangenheit schon mehrfach beschrieben (Wencker et al., 2003); (Shiraishi et al., 2004) Um herauszufinden, ob die Zellen durch Apoptose zugrunde gegangen waren, wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte einer Spezialfärbung unterzogen. Der Mechanismus basiert auf der biochemischen Eigenschaft des Enzyms T4-DNA-Ligase. Es verbindet die freien Enden der doppelsträngigen Proben-DNA, mit denen der synthetischen, biotinylierten Oligonukleotide des ISOL-Kits. Durch die Bindung an ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, welches das Substrat Diaminobezadin umsetzt, kann die Reaktion mittels Hellfeldmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die apoptotischen Zellareale stellten sich als braune „Plaques“ dar.

Zur Untersuchung lagen unterschiedlich lange induzierte (5 Tage bzw. 5 Wochen) konditionale Mutanten, nicht-induzierte Kontrollmutanten und konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutanten vor. Es zeigten sich interessante Bilder im Bezug auf die unterschiedliche Induktionsdauer der konditionalen Mutanten. Nach Beurteilung der Ergebnisse der ISOL-Färbung konnte man davon ausgehen, dass die Kardiomyozyten durch den programmierten Zelltod untergegangen waren. Nach 5 Tagen Tamoxifenbehandlung zeigten sich braune Ablagerungen in einem enormen Ausmaß, diffus in der Herzmuskulatur verteilt (Abbildung 24).

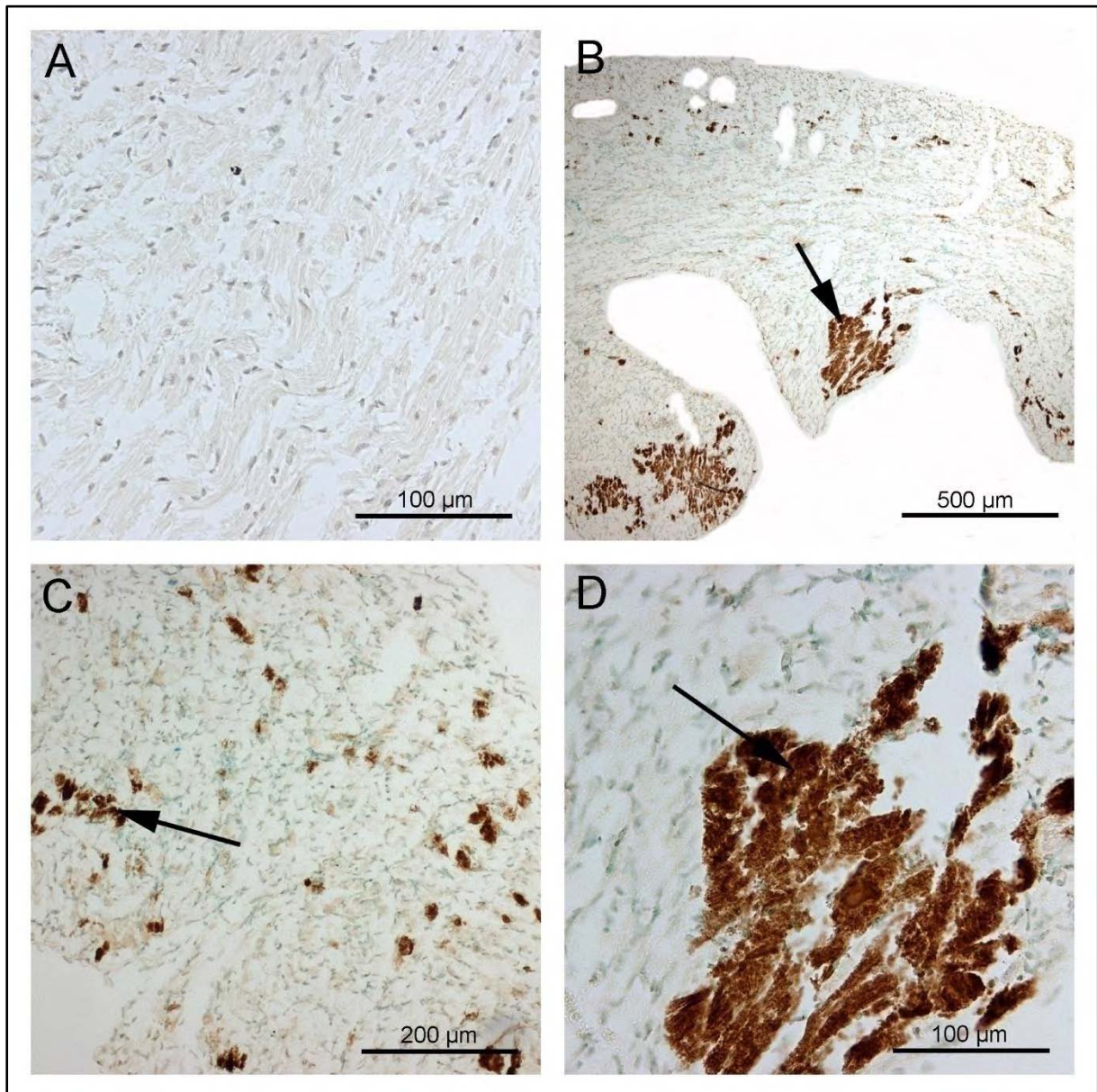


Abbildung 24: Nachweis von apoptotischen Zellbestandteilen in konditionalen Mutanten nach 5 aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifenbehandlung: Der Nachweis apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe der ISOL-Färbung durchgeführt. Der Mechanismus beruht auf dem Enzym T4-DNA-Ligase, das die freien Enden der Proben-DNA mit denen von biotinylierten Oligonukleotiden verknüpft. Durch die Bindung an ein Peroxidase-Konjugat wird ein Substrat umgesetzt. Die Reaktion wurde mittels Durchlichtmikroskopie sichtbar gemacht. (A) Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante (Tamoxifen -). Hier erkennt man die blass gefärbten Herzmuskelzellen mit ihren zentralen Kernen. (B) Übersichtsaufnahme der Kammerwand mit apoptotischen Zellen, die sich in der ISOL-Färbung als braune Plaques darstellen (Pfeil). Überall in der Kammerwand sind Zellbereiche zu finden, die Apoptose begehen. (C-D) Vergrößerte Aufnahmen der Apoptose.

Nach 5 Wochen Tamoxifenbehandlung zeigte sich ein anderes Bild. Es waren nur vereinzelt apoptotisch angefärbte Zellbestandteile zu erkennen (Abbildung 25). Da es sich um eine fünfwöchige Tamoxifenbehandlung handelte und die Reaktionen nach kürzer Behandlungszeit und bei der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}- Mutante bedeutend intensiver

ausfielen, könnte man spekulieren, dass es sich bei der Apoptose, um ein Ereignis handelte, dass in ungerichteten Phasen ablief und nicht kontinuierlich.

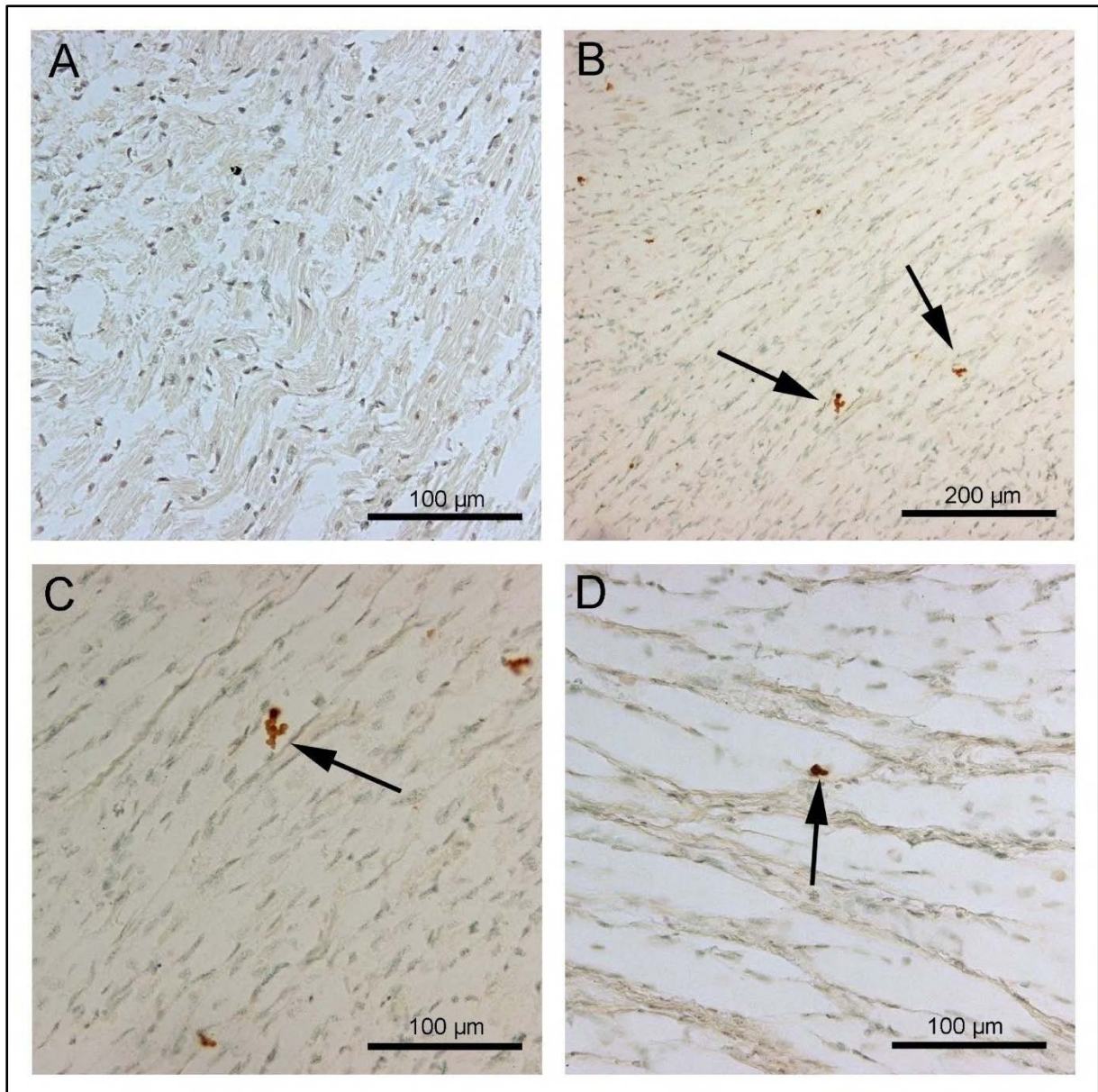


Abbildung 25: Nachweis von apoptotischen Zellbestandteilen in konditionalen Mutanten nach 5 Wochen Tamoxifenbehandlung: Der Nachweis apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe der ISOL-Färbung durchgeführt. **(A)** Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante. Hier erkennt man die blass gefärbten Herzmuskelzellen mit ihren zentralen Kernen. **(B)** In der Übersichtsaufnahme sind, im Vergleich zu Abbildung 24 nur sehr wenige apoptotische Färbungen (Pfeile) zu finden. **(C-D)** Die Vergrößerungen von B zeigen, dass es sich bei den braunen Plaques, um positive Reaktionen der ISOL-Färbung handelt und nicht um Artefakte. Allerdings ist die Intensität nicht mit der Intensität von Abbildung 24 und 26 zu vergleichen.

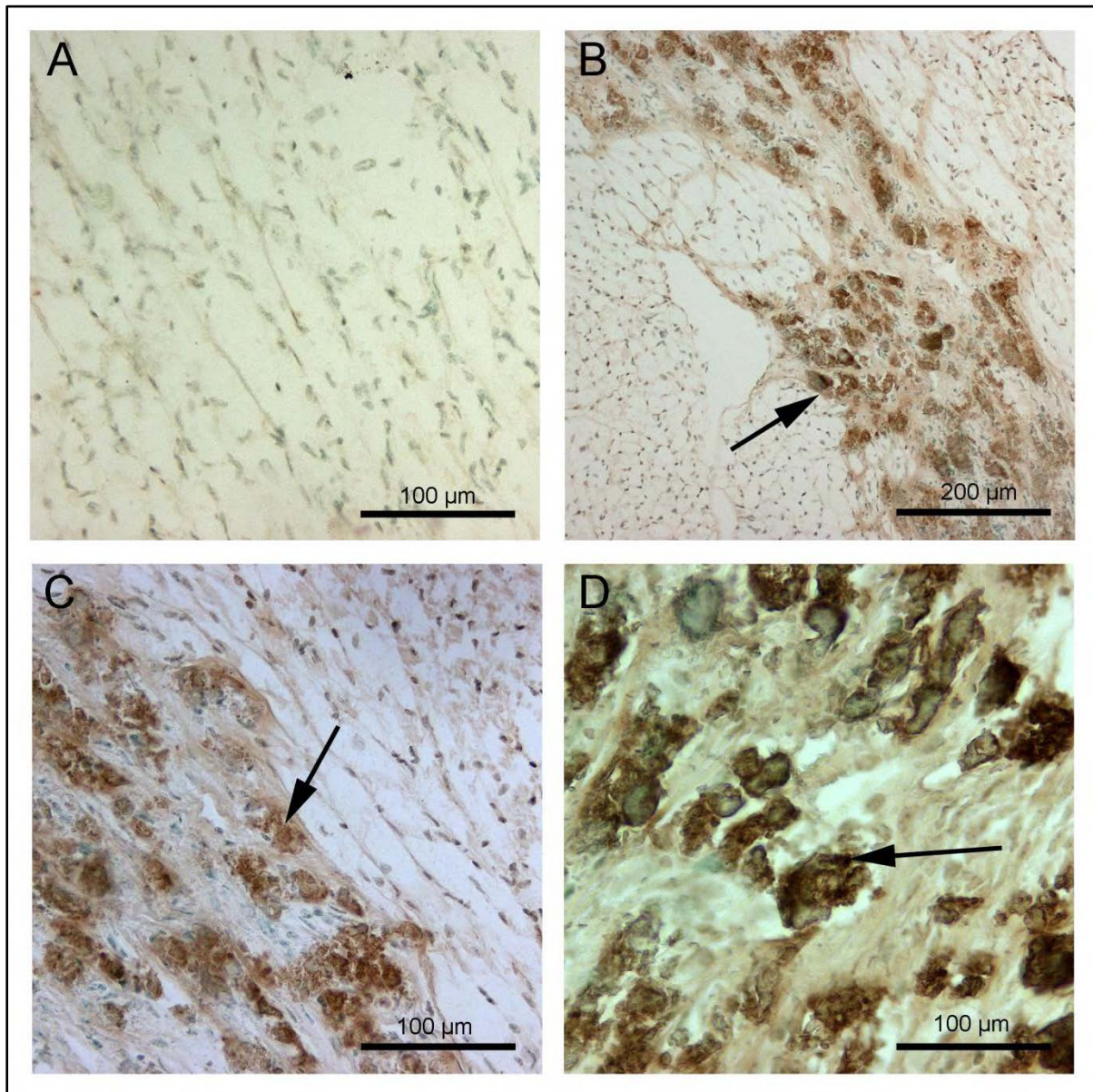


Abbildung 26: Nachweis von apoptotischen Zellbestandteilen in den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten: Erklärung des Mechanismus: siehe Abbildung 24 und 25 (A) Kontrolle (siehe Abbildung 24 bzw. 25). (B) In dieser Übersichtsaufnahme derselben konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante aus Abbildung 22 kann man deutlich erkennen, dass die schollig-zerfallenden Herzmuskelzellen durch programmierten Zelltod zugrunde gehen. Die zerfallenen Zellen zeigen in der ISOL-Färbung eine positive Reaktion und färben sich schmutzig-braun. (C-D) Detailaufnahmen der untergehenden Herzmuskelzellen (Pfeile).

In den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten zeigte sich wieder ein anderes Bild. Genau an den Stellen der schollig-zerfallenden Muskelzellen aus den histologischen Bildern (vergleiche Abbildung 22) zeigten sich die positiven Reaktionen der Apoptosefärbung (Abbildung 26). Die braunen Plaques waren in den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten nicht diffus verteilt, wie in den konditionalen Mutanten nach 5 Tagen Tamoxifenbehandlung, sondern zeigten sich lokal an den Stellen des Muskelzelluntergangs.

3.9. Immunfluoreszenz

3.9.1. Nachweis von Desmoglein 2 in den Glanzstreifen

Da in beiden DSG2-Mutanten nahezu keine wildtypische mRNA mehr synthetisiert wurde (Abbildung 16) und in den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten kein Desmoglein 2-Protein mehr nachweisbar war (Abbildung 17), konnte man davon ausgehen, dass es zu einer veränderten Verteilung von Desmoglein 2 in den Glanzstreifen des Herzens kam. Darüber hinaus war eine Abnahme des Dsg2-Signals in den Mutanten zu erwarten.

Um die Lokalisierung und die Konzentrierung von Desmoglein 2 in den Glanzstreifen der verschiedenen Mutanten beurteilen zu können, wurden Kryostatschnitte angefertigt, die nach Antigendemaskierung durch Kochen in Zitratpuffer mit einem Desmoglein 2-Antikörper inkubiert wurden. Als Zweitantikörper diente ein Cy3- α -rb-Antikörper.

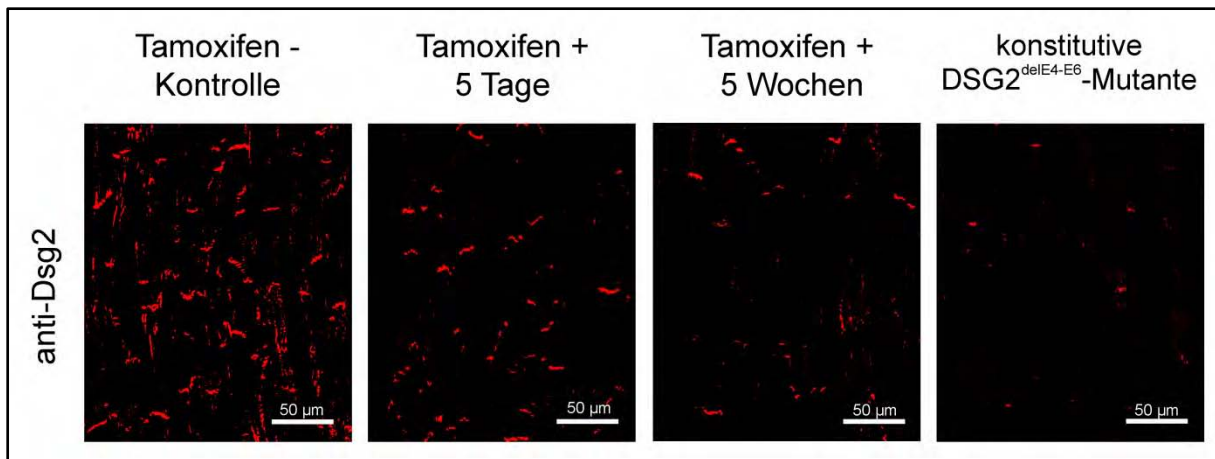


Abbildung 27: Dsg2-Markierung im Herzen: Untersucht wurden über 5 Tage bzw. 5 Wochen induzierte konditionale Mutanten, eine nicht-induzierte konditionale Kontrollmutante und konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutanten. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert und zur Antigendemaskierung in Zitratpuffer gekocht. Anschließend wurden die Herzgewebeschnitte mit einem Dsg2-Antikörper und dem Zweitantikörper (Cy3- α -rb) inkubiert. Auffällig ist die Abnahme des Dsg2-Signals. In der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante sind nur noch ganz vereinzelt Glanzstreifen angefärbt. Größenbalken: 50 µm

Untersucht wurden konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutanten und konditionale Mutanten, in denen die Rekombination des DSG2-Lokus über eine Induktionsdauer von 5 Tagen bzw. 5 Wochen ausgelöst wurde. Als Kontrolle dienten konditionale Mutanten, bei denen die Rekombination nicht ausgelöst wurde. Wie zu erwarten, zeigte sich eine starke Abnahme des Desmoglein 2-Signals. Bereits nach 5 Tagen Behandlungsdauer waren deutlich weniger Glanzstreifen durch den Dsg2-Antikörper markiert. In den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten konnte nur noch ein ganz niedriges Desmoglein 2-Signal nachgewiesen werden. Nur vereinzelt ließen sich noch Glanzstreifen markieren (Abbildung 27).

3.9.2. Nachweis der desmosomalen Proteine Plakoglobin, Plakophilin 2 und Desmoplakin in den Glanzstreifen

Durch das Fehlen großer Teile der extrazellulären Domänen 1 und 2 des Desmoglein 2-Proteins könnte die Verknüpfung von Desmoglein 2 mit Desmocollin 2 im extrazellulären Bereich und mit Plakophilin 2 und Plakoglobin im intrazellulären Bereich der Desmosomen beeinträchtigt sein. Da die Immunfluoreszenz eine deutliche Abnahme der Desmoglein 2-Konzentration in den Glanzstreifen der mutierten Tiere gezeigt hatte und es zu keiner Umverteilung desselben Proteins kam, war es von besonderem Interesse, die desmosomalen Proteine Plakoglobin, Plakophilin 2 und Desmoplakin zu untersuchen.

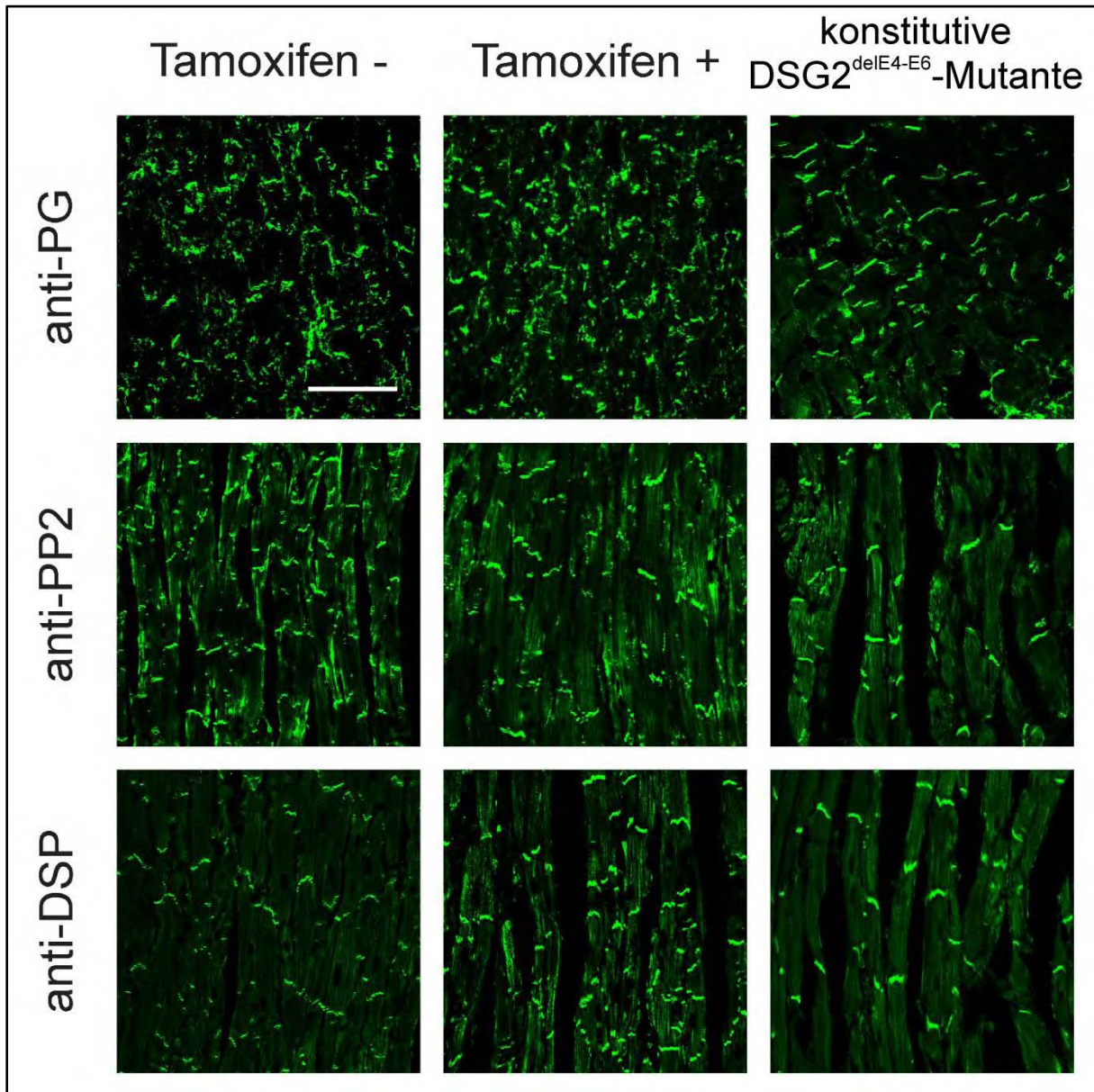


Abbildung 28: Markierung der Glanzstreifen durch die desmosomalen Proteine Plakoglobin (PG), Plakophilin 2 (PP2) und Desmoplakin (DSP): Untersucht wurden konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutanten und über 5 Tage induzierte konditionale Mutanten. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert und zur Antigendemaskierung in Zitratpuffer gekocht. Anschließend wurden die Herzgewebeschnitte mit einem DSP- und einem PP2-Antikörper inkubiert. Das Gewebe für die PG-Inkubation wurde mittels Isopentan fixiert. Die Signale von Plakophilin 2, Plakoglobin und Desmoplakin erscheinen unverändert. Größenbalken: 50 µm

Fraglich war, ob es auch bei diesen Proteinen zu Änderungen in der Konzentrierung und der Verteilung kommt. Wenn es, durch das Fehlen oder den ungünstigen Einbau von Dsg2 und der damit eingeschränkten Funktionalität der Desmosomen, insgesamt zu einem Rückgang der Anzahl an Desmosomen in den Glanzstreifen kam, könnte dies auch zu einer Abnahme der Konzentration und zu einer Umverteilung der anderen desmosomalen Proteine geführt

haben. Dieses Experiment zeigte keine großen Veränderungen: die Signale von Desmoplakin, Plakoglobin und Plakophilin 2 waren unverändert. Auffällig war, dass die Glanzstreifen deutlicher und in geringerer Anzahl zu finden waren (Abbildung 28).

3.9.3. Nachweis von N-Cadherin, β -Catenin und Connexin 43 in den Glanzstreifen

Die immunhistologische Betrachtung von N-Cadherin, β -Catenin und Connexin 43 war von Bedeutung, da die Möglichkeit bestand, dass die beeinträchtigte Funktionalität der Desmosomen durch ein verstärktes Auftreten von Fascia adhaerens und Gap junctions in den Glanzstreifen kompensiert werden könnte. In diesem Fall hätte es zu einer Veränderung des N-Cadherin-oder β -Catenin-Signals kommen können. Während N-Cadherin zu den klassischen Cadherinen und β -Catenin zu den Adapterproteinen der Cateninfamilie gehört, ist Connexin 43 ein Bestandteil der Gap junctions, die essentiell für die Erregungsweiterleitung zwischen den Herzmuskelzellen sind. Da es bei der Erkrankung ARVC zu Arrhythmien kommen kann, war es von großem Interesse auch diese Zellverbindungen zu untersuchen und herauszufinden, ob die Mutation im Desmoglein 2-Gen Auswirkungen auf die Konzentrierung von Connexin 43 hatte. In der Vergangenheit wurde bereits eine verminderte Expression von Connexin 43 in ARVC-Patienten mit heterozygoten Plakophilin 2-Mutationen festgestellt (Fidler et al., 2008).

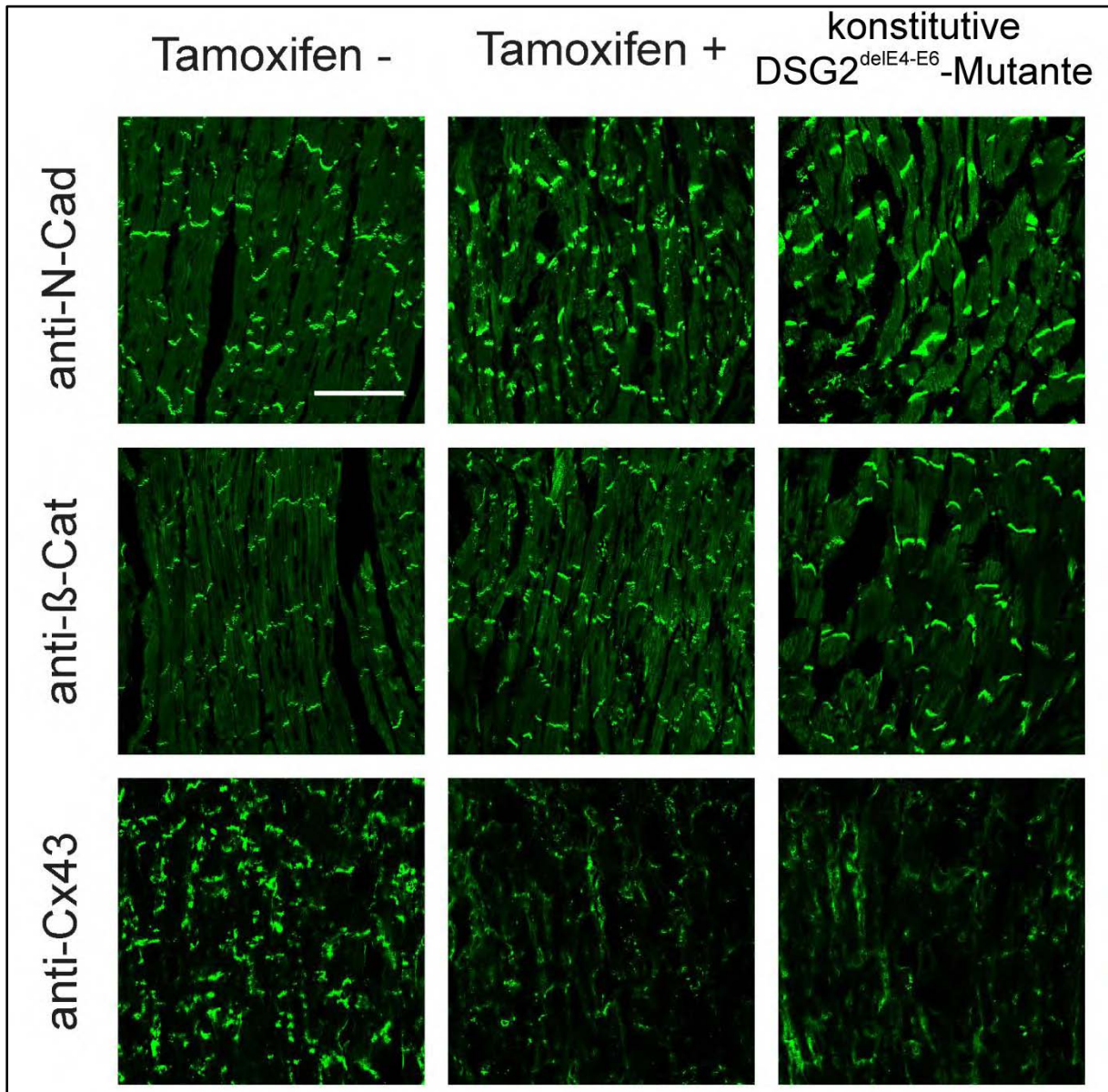


Abbildung 29: Markierung der Zelladhäsionsproteine N-Cadherin, β-Catenin und Connexin 43 in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine nicht-induzierte konditionale Kontrollmutante und eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Die Gewebe für die Inkubation mit dem N-Cadherin- und dem β-Catenin-Antikörper wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Das Gewebe für die Cx 43-Inkubation wurde mittels Isopentan fixiert. Besonders auffällig ist die starke Abnahme des Connexin 43-Signals in der konditionalen und der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Da Connexin 43 ein wichtiger Bestandteil der Gap junctions ist, sind bei diesen Tieren erhebliche Probleme in der Erregungsweiterleitung (Arrhythmien) zu erwarten. Die Signale der N-Cadherin- und β-Catenin-Markierung zeigen keine Veränderung. Größenbalken: 50 μm

Besonders auffällig bei diesem Experiment war die starke Abnahme des Connexin 43-Signals in den beiden Mutanten (Abbildung 29). Die Veränderungen in den Glanzstreifen durch die gestörten Desmosomen schienen enorme Auswirkungen auf die Konzentrierung von

Connexin 43 zu haben. Da dieses Protein ein essentieller Bestandteil der Gap junctions ist, müssten die mutierten Tiere starke klinische Symptome, in Form von Arrhythmien zeigen.

3.9.4. Kolokalisierung von Desmoglein 2 mit Plakophilin 2 und Desmoplakin

Nachdem die Konzentrationsänderungen der einzelnen desmosomalen Proteine (3.9.2.) untersucht wurden, sollte geklärt werden, ob es zu einer Umverteilung derselben Proteine innerhalb der Glanzstreifen kam. Dies ließ sich am besten beantworten, indem die Signale der zu untersuchenden Proteine mit dem Signal des veränderten Proteins, Desmoglein 2, verglichen wurden. Um dies optimal beurteilen zu können, wurde eine Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Desmoglein 2 und das jeweils zu untersuchende Protein (Desmoplakin oder Plakophilin 2) durchgeführt. Unter normalen Umständen müssten die Proteine Plakophilin 2 und Desmoplakin mit Desmoglein 2 kolokalisieren, da sich alle drei Proteine in den Desmosomen der Glanzstreifen des Herzens konzentrieren.

Nach Fixierung der Herzgewebe in 2 % iger Paraformaldehydlösung wurden Kryostatschnitte von 5 Tage induzierten konditionalen Mutanten und konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten angefertigt. Die Schnitte wurden gleichzeitig mit einem Desmoglein 2-Antikörper und einem Plakophilin 2 - oder Desmoplakin-Antikörper inkubiert.

Die Doppelimmunfluoreszenz von Plakophilin 2 (Abbildung 30) zeigte keine großen Auffälligkeiten. Die beiden Proteine Desmoglein 2 und Plakophilin 2 kolokalisierten (gelbes Signal) erwartungsgemäß. Nur in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante war kaum eine Kolokalisierung mehr nachweisbar (grünes Signal). Dieser Umstand lag an der starken Abnahme von Desmoglein 2 in den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten. Darüber hinaus zeigten sich, die schon zuvor beschriebenen (3.9.2.) Veränderungen, wie die Abnahme der Desmoglein 2-Konzentrierung und die reduzierte Anzahl an Glanzstreifen.

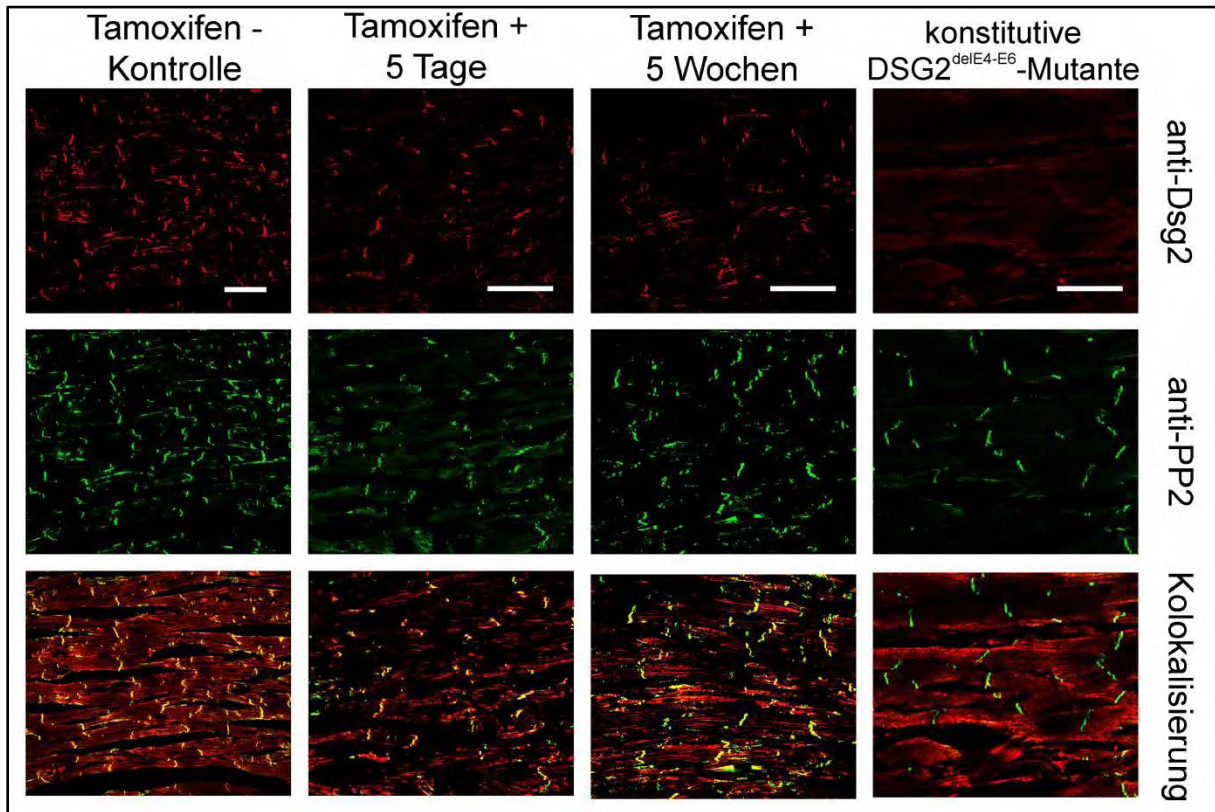


Abbildung 30: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von Plakophilin 2 (PP2) und Desmoglein 2 (Dsg2) in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine 5 Wochen induzierte konditionale Mutante und eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Die Gewebeschnitte wurden gleichzeitig mit einem Antikörper gegen Dsg2 und einem Antikörper gegen PP2 inkubiert. Deutlich zu erkennen ist die starke Abnahme des Dsg2-Signals und die leichte Abnahme des PP2-Signals. Während in der Kontrolle und nach 5 Tagen Tamoxifenbehandlung noch eine deutliche Kokolorisierung der beiden Proteine zu erkennen ist (gelbe Färbung des Signals), nimmt diese nach 5 Wochen Induktion ab (grünere Färbung). In der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante ist keine Kokolorisierung von Dsg2 und PP2 mehr nachweisbar (grüne Färbung der Glanzstreifen). Größenbalken: 50 µm

Die Doppelimmunfluoreszenz von Desmoplakin mit Desmoglein 2 zeigte nur geringe Auffälligkeiten. Die beiden konditionalen Mutanten (nach 5 Tagen bzw. 5 Wochen Tamoxifenbehandlung) zeigten eine Kokolorisierung von Desmoglein 2 mit Desmoplakin. Lediglich die Anzahl der Glanzstreifen war reduziert. In der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante war nur ein sehr niedriges Desmoglein 2-Signal nachweisbar, sodass auch keine Kokolorisierung stattfand (grünes Signal).

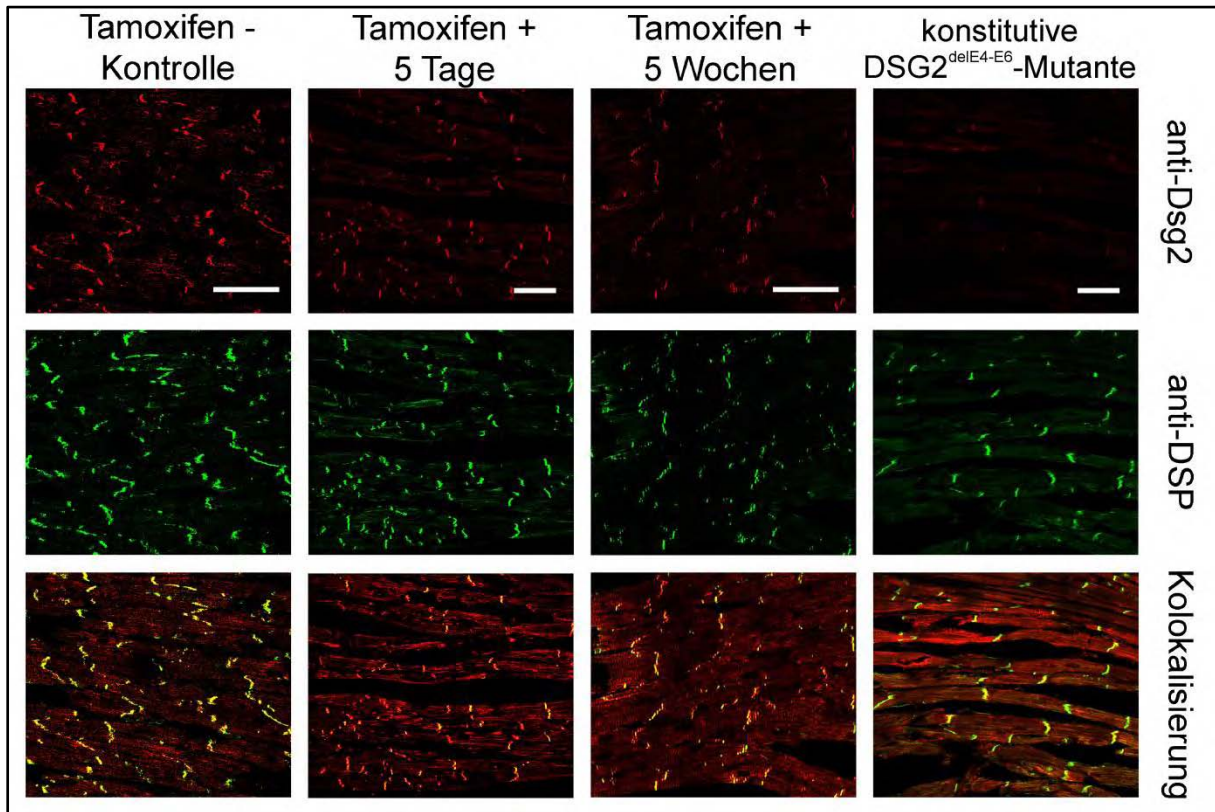
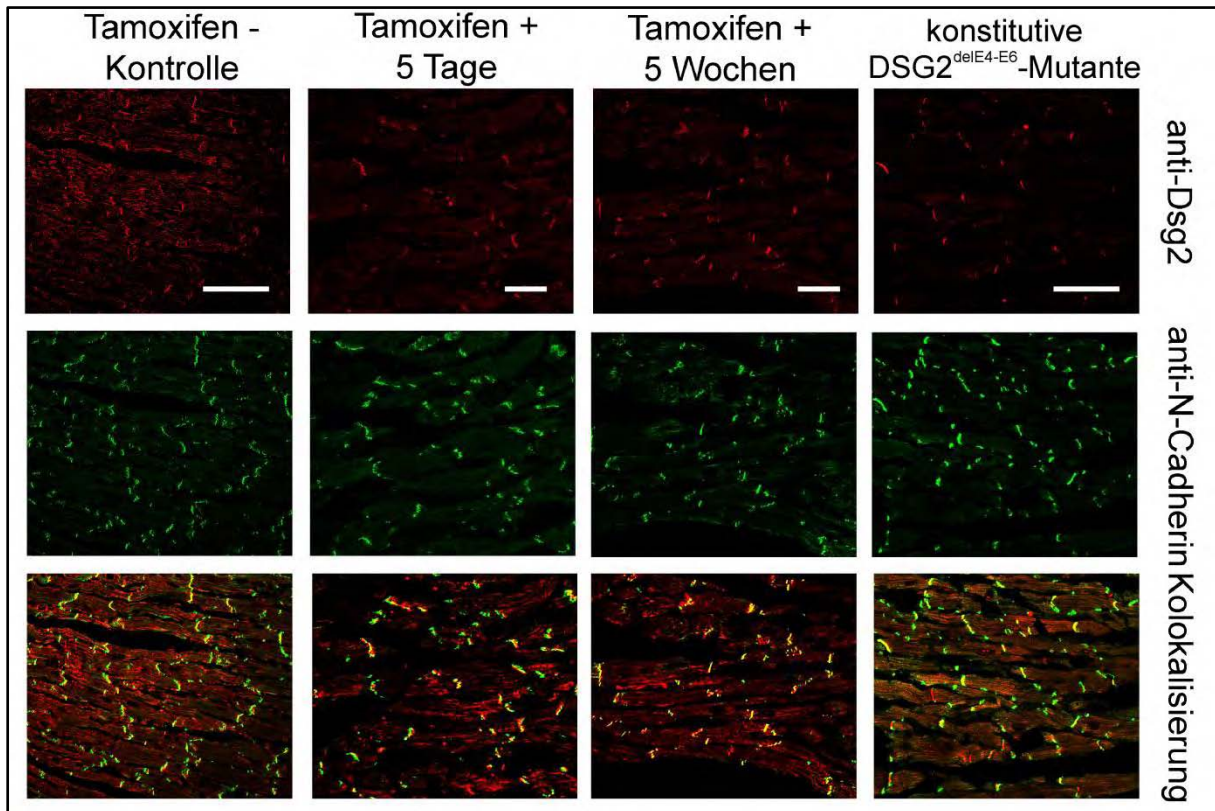


Abbildung 31: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von Desmoplakin (DSP) und Desmoglein 2 (Dsg2) in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine 5 Wochen induzierte konditionale Mutante und eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Die Gewebeschnitte wurden gleichzeitig mit einem Antikörper gegen Dsg2 und einem Antikörper gegen DSP inkubiert: Deutlich zu erkennen ist die starke Abnahme des Dsg2-Signals und die leichte Abnahme des DSP-Signals. Während in der Kontrolle und in den konditionalen Mutanten noch eine Kolokalisation der beiden Proteine zu erkennen ist (gelbe Färbung des Signals), nimmt diese in der DSG2^{delE4-E6}-Mutante deutlich ab (grünere Färbung der Glanzstreifen). Größenbalken: 50 μ m

Wie zu erwarten kolokalisierten beide Proteine mit Desmoglein 2. Zudem wurden die Ergebnisse der zuvor gezeigten Experimente (3.9.1. und 3.9.2.) bestätigt. Innerhalb der Mutanten kam es zu einer starken Reduzierung der Desmoglein 2-Konzentrierung und die Anzahl der Glanzstreifen nahm insgesamt ab. Weiterhin zeigte sich hier eine geringfügige Reduzierung der Desmoplakin- und Plakophilin 2-Konzentrierung.

3.9.5. Kolokalisierung von Desmoglein 2 mit N-Cadherin und β -Catenin**Abbildung 32: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von N-Cadherin und Desmoglein 2**

(Dsg2) in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine 5 Wochen induzierte konditionale Mutante und eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Die Gewebeschnitte wurden gleichzeitig mit einem Antikörper gegen Dsg2 und einem Antikörper gegen N-Cadherin inkubiert: Deutlich zu erkennen ist die leichte Zunahme des N-Cadherin-Signals. Während in der Kontrolle und in den konditionalen Mutanten noch eine Kolokalisation der beiden Proteine zu erkennen ist (gelbe Färbung des Signals), nimmt diese in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante deutlich ab (grünere Färbung der Glanzstreifen). Größenbalken: 50 μ m

Wie zu erwarten zeigten die Proteine Plakophilin 2 und Desmoplakin eine Kolokalisation mit Desmoglein 2 in den Glanzstreifen der mutierten Herzen. Die Proteine N-Cadherin und β -Catenin, sind aber nicht, wie zuvor PP2 und DSP, in den Desmosomen, sondern in anderen Adhärenzverbindungen der Glanzstreifen lokalisiert. Es hätte in den Mutanten zu einer Umverteilung der Proteine kommen können. Aus diesem Grund wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen Desmoglein 2 und N-Cadherin oder β -Catenin angefertigt. Nach Fixierung der Herzgewebe in 2 % iger Paraformaldehydlösung wurden Kryostatschnitte von konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten und konditionalen Mutanten angefertigt und gleichzeitig mit einem Antikörpern gegen Desmoglein 2 und N-Cadherin oder β -Catenin inkubiert.

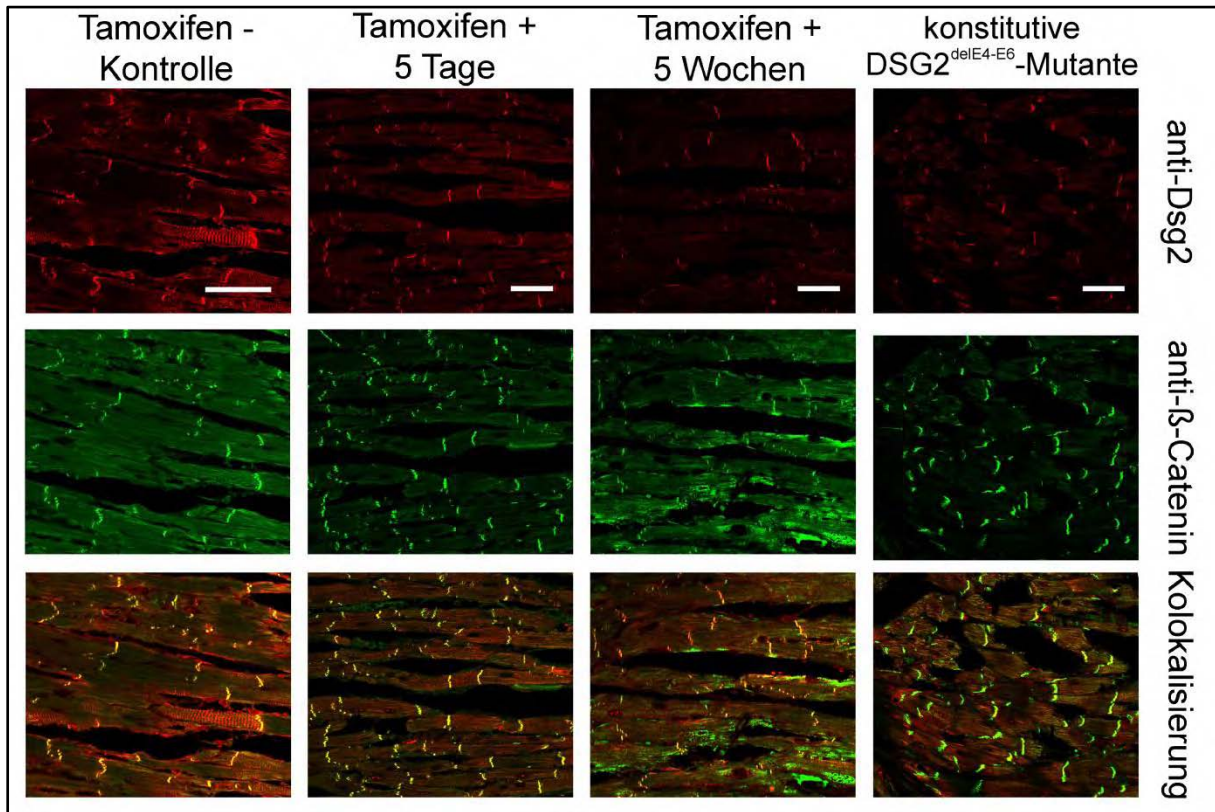


Abbildung 33: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von β -Catenin und Desmoglein 2 (Dsg2) in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine 5 Wochen induzierte konditionale Mutante und eine konstitutive $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Die Gewebeschnitte wurden gleichzeitig mit einem Antikörper gegen Dsg2 und einem Antikörper gegen β -Catenin inkubiert: Während in der Kontrolle und in den konditionalen Mutanten noch eine Kokolorisierung der beiden Proteine zu erkennen ist (gelbe Färbung des Signals), nimmt diese in der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante deutlich ab (grünere Färbung der Glanzstreifen). Größenbalken: 50 μm

Die Doppelimmunfluoreszenz von Desmoglein 2 und N-Cadherin zeigte eine Kokolorisierung (Abbildung 32) in den konditionalen Mutanten. Allerdings bestand kein Unterschied zwischen der Kontrolle und den Mutanten, sodass man nicht davon ausgehen konnte, dass es zu einer Umverteilung kam. Da das Signal von N-Cadherin in der über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und in der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante leicht stieg und die Desmoglein 2-Konzentration abfiel, ließ sich erklären, warum keine klare Kokolorisierung mehr in der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante vorhanden war. Es zeigte sich in der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante nur noch ein Signal für N-Cadherin. In der Doppelimmunfluoreszenz von Desmoglein 2 mit β -Catenin (Abbildung 33) stellte sich die Situation ähnlich dar. Da die β -Catenin-Konzentration in der, über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und der konstitutiven $DSG2^{\text{delE4-E6}}$ -Mutante gleich blieb und die Desmoglein 2-Konzentration abfiel, zeigte sich keine deutliche Kokolorisierung (grün-gelbe

Signale) mehr. In der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante konnte nur noch β -Catenin nachgewiesen werden.

3.10. Elektronenmikroskopische Untersuchung der DSG2-Mutanten

Um die Veränderungen der Desmosomen im Hinblick auf ultrastrukturelle Veränderungen genauer untersuchen zu können, wurden elektronenmikroskopische Analysen der einzelnen Mutanten, durchgeführt. Da die Histologie erhebliche Unterschiede im Vergleich zu den wildtypischen Herzen (3.7.; Abbildung 20-23) gezeigt hatte und in der Immunhistologie eine Veränderung der Konzentration der untersuchten Adäsionsproteine nachgewiesen wurde, konnte man davon ausgehen, dass die elektronenmikroskopische Analyse der Mutanten Veränderungen in den Desmosomen zeigen würde. Untersucht wurden konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutanten, die in der histologischen Untersuchung starke Veränderungen gezeigt hatten. Von den konditionalen Mutanten wurden Tiere untersucht, deren DSG2-Lokus über einen Zeitraum von 5 Tagen bzw. 5 Wochen, durch Behandlung mit Tamoxifen rekombiniert wurde. Im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen konnten keine Unterschiede in der ultrastrukturellen Morphologie der Glanzstreifen in den konditionalen Mutanten festgestellt werden, die über einen Zeitraum von 5 Tagen induziert wurden. Die Glanzstreifen zeigten ein Wechsel von Desmosomen und Fascia adhaerens mit einstrahlenden Aktinfilamenten. Es gab Bereiche in denen Fascia adhaerens überwogen und solche, in denen besonders viele Desmosomen zu finden waren. Nach 5 Wochen Induktion stellte sich die Situation sehr ähnlich dar. Allerdings wurde es schwieriger Bereiche in den Glanzstreifen zu finden, in denen viele Desmosome vorhanden waren. In der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante konnten keine Desmosomen mehr dargestellt werden, die Glanzstreifen bestanden hier nur noch aus Fascia adhaerens.

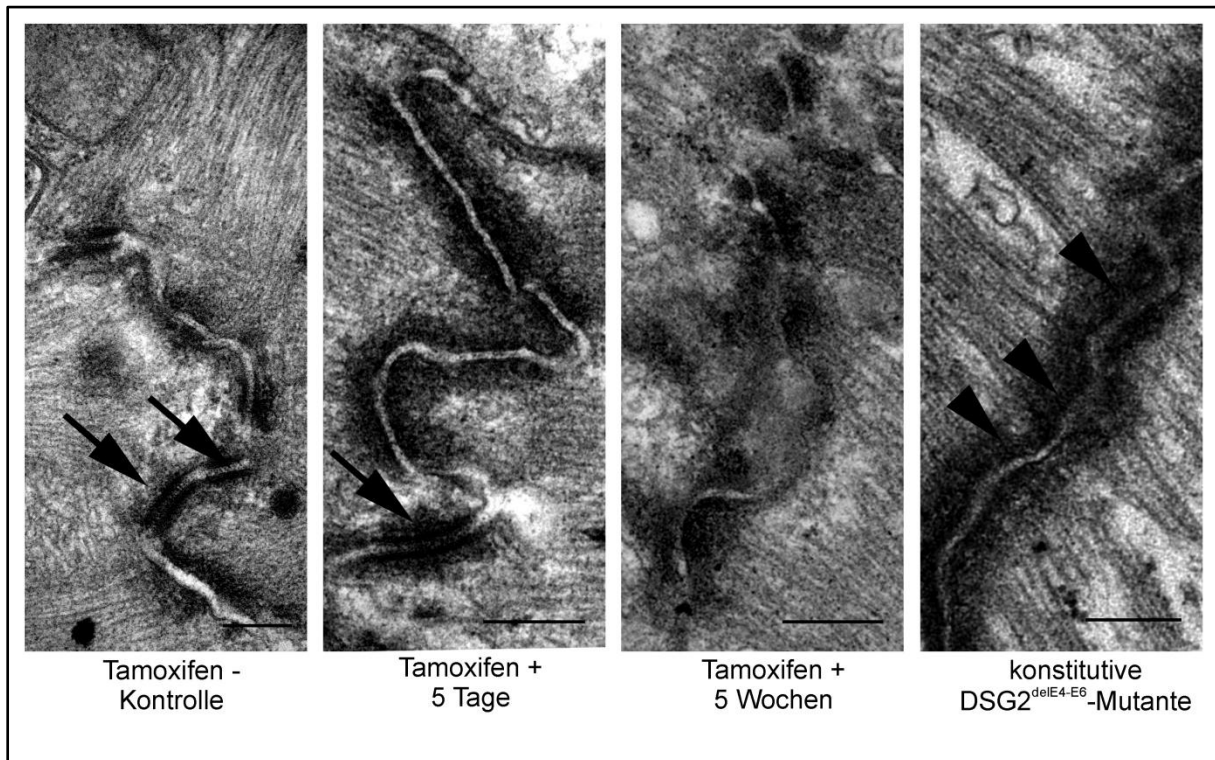


Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Glanzstreifen der transgenen Mäuse: Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante (Tamoxifen -). Hier sieht man in der „*area composita*“ der Glanzstreifen deutlich die Desmosomen zwischen den Fascia adhaerens liegen (Pfeile). Nach einer fünftägigen Behandlung mit Tamoxifen liegen zwischen den Fascia adhaerens weiterhin Desmosomen in der „*area composita*“. Nach einer fünföchigen Behandlung mit Tamoxifen wird es schwieriger Desmosomen in den Glanzstreifen zu finden. Bei der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante lassen sich keine Desmosomen mehr finden. Die „*area composita*“ der Glanzstreifen des Herzens setzt sich nun vollständig aus Fascia adhaerens zusammen (Pfeilkopf). Größenbalken: 250 nm

Die Mitochondrien von konstitutivn DSG2^{delE4-E6}-Mutanten zeigten in der elektronenmikroskopischen Betrachtung erhebliche Veränderungen (Abbildung 35). Die wildtypische Kontrolle zeigte den typischen Leisten-Typ (Crista-Typ) (Abbildung 35, A), mit den, an den hohen Stoffwechsel der Herzmuskulatur angepassten, dichtgepackten inneren Leisten. Die Leisten der Mitochondrien der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten dagegen waren weitaus weniger dichtgepackt und zeigten (Abbildung 35, B) Zeichen von vakuolärer Degeneration, die an der Schwellung und Deformierung der Mitochondrien zu erkennen waren. Die Sarkomere der DSG2^{delE4-E6}-Mutanten lagen lose im Gewebe und waren teilweise zerrissen (Abbildung 35, C und D).

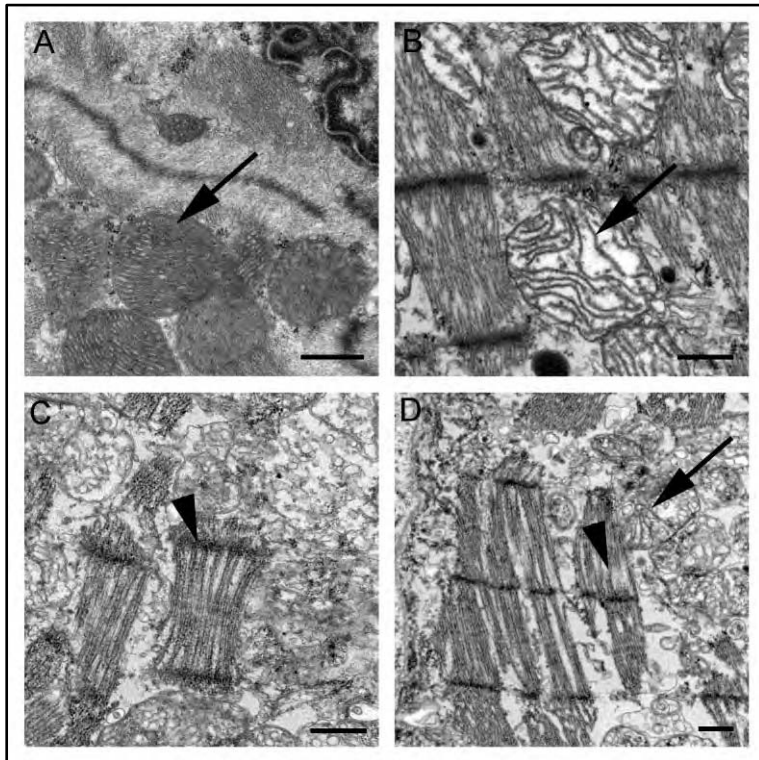


Abbildung 35: Elektronenmikroskopische Darstellung der Mitochondrien und Sarkomere von konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten: (A) Mitochondrien im Herzgewebe einer wildtypischen Maus vom Crista-Typ (Pfeil) (B) Mitochondrien im Herzgewebe einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante (Pfeil) (C) „Abgerissenes“ Sarkomer im Herzgewebe einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante. (D) Zerstörte Sarkomere (Pfeil). Größenbalken: 500 nm

3.11. Immunoblot

Da die Immunfluoreszenzergebnisse teilweise Unterschiede in der Konzentrierung der desmosomalen Proteine Plakoglobin, Plakophilin 2 und Desmoplakin und des Zelladhäsionsproteins β -Catenin in den Glanzstreifen der Mutanten gezeigt hatten (siehe 3.9.; Abbildungen 30 und 33) sollten diese in Western Blot-Analysen weiter detektiert werden. Dazu wurden aus den Proben von erfolgreich induzierten konditionalen Mutanten (5 Tage bzw. 5 Wochen) und konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten Proteinextrakte hergestellt und die Konzentration mittels Bradford-Analyse bestimmt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proben geblottet und mit den Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle kam ein Aktin-Antikörper zum Einsatz. Untersucht wurden zum Einen die desmosomalen Proteine Plakoglobin und Plakophilin 2 (Abbildung 37 und 38) und zum Anderen das klassische Adapterprotein β -Catenin. Die Analyse von Plakoglobin (Abbildung 38) zeigte in der

konditionalen Mutante nach 5 Wochen Induktion und in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante ein stärkeres Signal (Abbildung 38). Die Plakophilin 2-Banden aller Gewebeproben zeigten eine vergleichbare Intensität und Größe (Abbildung 37). β -Catenin zeigte im Vergleich zu den übrigen Proben, in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante eine geringfügig schmalere Bande. Es wurden weitere Western Blot-Analyse aus Gesamtproteinextrakten der transgenen Mäuse durchgeführt, um die Zielgene der an ARVC beteiligten Signalkaskaden zu detektieren. Um die Beteiligung des β -Catenin/Wnt-Signalwegs zu untersuchen, wurden die Proteinextrakte nach dem Blotten mit einem Antikörper gegen Cyclin D1 inkubiert (Abbildung 36). Es zeigte sich eine starke Zunahme des Cyclin D1-Signals in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und in der über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante (Abbildung 36).

Das Enzym p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) ist nachweislich an der Entstehung von Herzerkrankungen beteiligt und führt bei zu geringer Konzentration zu einer Dysfunktion des Herzens (Mudd et al., 2088). Um eine Beteiligung dieses Enzyms an der Entstehung der Herzveränderungen der transgenen Mäuse zu untersuchen, wurden Gesamtproteinextrakte mit Antikörpern gegen p38 MAPK und gegen die aktive, phosphorylierte Form p38^p (phospho) MAPK inkubiert (Abbildung 39 und 40). In der, über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante, sowie in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante zeigte sich eine deutliche Abnahme der Bandenintensität bei beiden Proteinen.

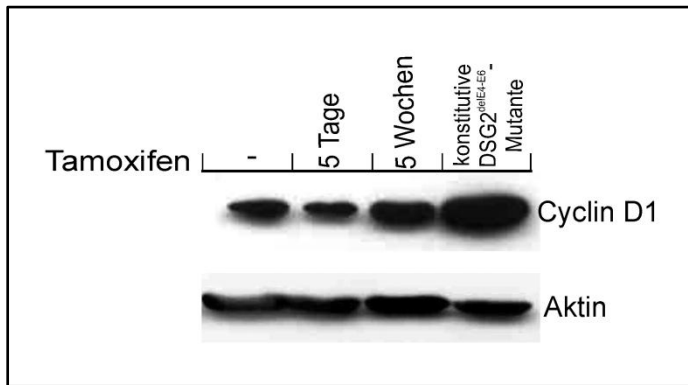


Abbildung 36: Western-Blot Analyse von Cyclin D1: Es wurden Proteinextrakte aus den Herzen einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und aus konditionalen Mutanten gewonnen, die jeweils 5 Tage bzw. 5 Wochen mit Tamoxifen behandelt wurden. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen Cyclin D1 inkubiert. Der Vergleich der Bandenstärke, der über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante mit der Kontrolle zeigt einen deutlichen Unterschied. Die Banden der Mutanten zeigen eine starke Zunahme in der Strahlkraft.

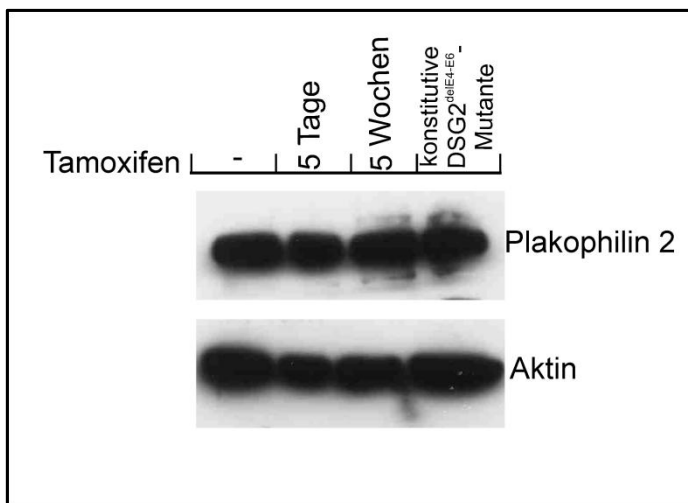


Abbildung 37: Western-Blot-Analyse des desmosomalen Proteins Plakophilin 2:

Es wurden Proteinextrakte aus den Herzen einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und aus konditionalen Mutanten gewonnen, die jeweils 5 Tage bzw. 5 Wochen mit Tamoxifen behandelt wurden. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante. Die Proben wurden mit einem Plakophilin 2-Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein Aktin-Antikörper. Die Proteinextrakte der Mutanten und der Aktinkontrolle zeigen jeweils eine Bande vergleichbarer Intensität und Größe.

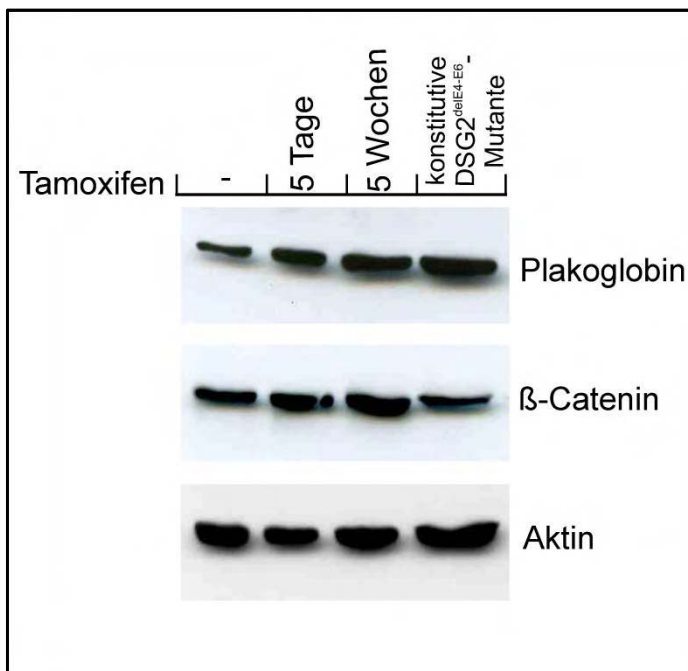


Abbildung 38: Western-Blot-Analysen der Zelladhäsionsproteine Plakoglobin und β-Catenin:

Es wurden Proteinextrakte aus den Herzen einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und aus konditionalen Mutanten gewonnen, die jeweils 5 Tage bzw. 5 Wochen mit Tamoxifen behandelt wurden. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante. Die Proben wurden mit einem Plakoglobin- und einem β-Catenin-Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein Aktin-Antikörper. Im Anschluss wurden die Intensität und die Größe der entstandenen Banden verglichen. Auffällig ist eine geringfügige Zunahme der Strahlkraft der Plakoglobin-Bande und eine geringfügige Abnahme der β-Catenin-Bandenintensität in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante.

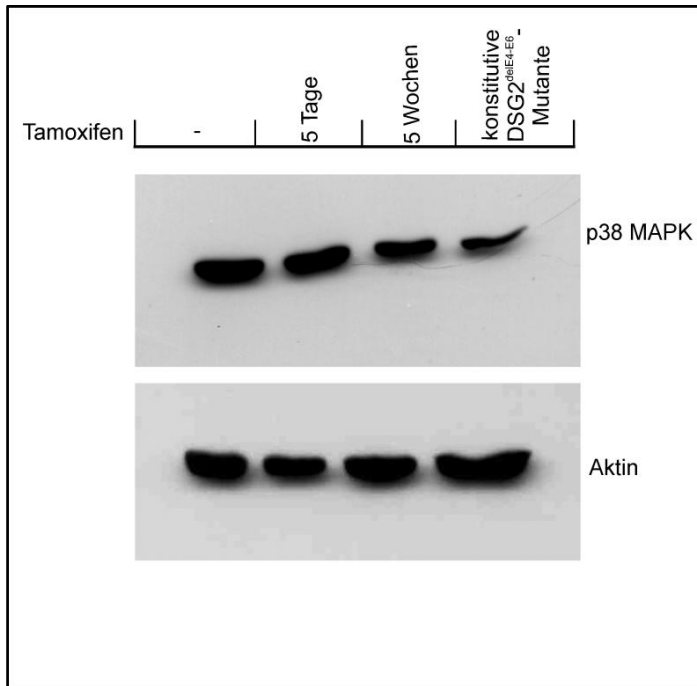


Abbildung 39: Western Blot-Analyse des Enzyms p38 MAPK: Es wurden Proteinextrakte aus den Herzen einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und aus konditionalen Mutanten gewonnen, die jeweils 5 Tage bzw. 5 Wochen mit Tamoxifen behandelt wurden. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen das Protein p38 MAPK inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein Aktin-Antikörper. Im Anschluss wurden die Intensität und die Größe der entstandenen Banden verglichen. Die Proteinextrakte der nicht-induzierten und der über 5 Tage induzierten Proben zeigen jeweils eine Bande vergleichbarer Intensität und Größe. Die Banden der über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und die der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante zeigen ein geringeres apparentes Molekulargewicht. Die gleichmäßige Intensität der Aktinbanden belegt die gleichmäßige Proteinkonzentration in den Proben.

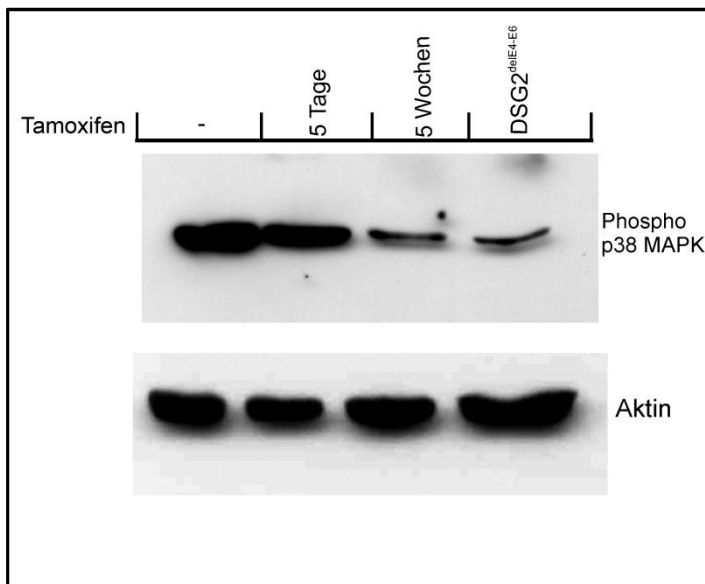


Abbildung 40: Western Blot-Analyse des Enzyms p38^P (phospho) MAPK: Proben: siehe Abbildung 39. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen das Protein Phospho p38 MAPK inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein Aktin-Antikörper. Im Anschluss wurden die Intensität und die Größe der entstandenen Banden verglichen. Die Proteinextrakte der nicht-induzierten und der über 5 Tage induzierten Proben zeigen jeweils eine Bande vergleichbarer Intensität und Größe. Die Banden der über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und die der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante zeigen ein geringeres apparentes Molekulargewicht. Die gleichmäßige Intensität der Aktinbanden belegt die gleichmäßige Proteinkonzentration in den Proben.

4. Diskussion

In der Arbeit von Kalliopi Pilichou (Pilichou et al., 2006) wurde gezeigt, dass Mutationen im Exon 5 des Desmoglein 2-Gens bei ARVC-Patienten vorkommen (siehe auch 1.5.). Den, in dieser Arbeit untersuchten transgenen Mäusen fehlte genau dieses Exon zusammen mit den zwei weiteren Exonen 4 und 6. Da beide transgene Tierstämme extreme Veränderungen gezeigt hatten, bestand nun ein großes Interesse, diese in einen Zusammenhang mit der Erkrankung ARVC zu bringen und eine mögliche Erklärung für die Entstehung der Erkrankung zu entwickeln.

4.1. Pathologische Aspekte

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie gehört zu den dilatativen Kardiomyopathien, deren Hauptveränderung sich in einem ausgeweiteten (dilatierten) Herz zeigt. Generell unterscheidet man zwischen einer kompensatorischen, tonogenen und einer dekom kompensatorischen, myogenen Dilatation (Dahme E., Weiss E., 1999; Meurer D., 1999). Die tonogene Dilatation stellt eine Anpassung an veränderte Blutmengen dar und ist für diese Erkrankung die unwahrscheinlichere Variante. Für die myogene Dilatation sind insbesondere degenerative Herzmuskelveränderungen maßgebend. In der Pathologie stellen sich diese erkrankten Herzen folgendermaßen dar: das relative Herzgewicht ist erhöht und das Herz nimmt eine kugelförmige Gestalt an (sog. „Kugelherz“). Es zeigen sich alle möglichen Degenerationsformen, wie Fibrosen, Gerüstsklerosen, Fettanreicherungen und periphere Stauungszustände. Entzündungsanzeichen sind selten anzutreffen (Dahme E., Weiss E., 1999; Meurer D., 1999). Klinische Symptome sind gering und zeigen sich meist sehr spät, in plötzlichem Bewusstseinsverlust, Arrhythmien, Vorhofflimmern, Dyspnoe, Neigung zu Ergüssen und Ödemen und plötzlichem Herztod. Um die Auffälligkeiten der transgenen Mäuse genau interpretieren zu können und in einen Zusammenhang mit der Erkrankung ARVC zu bringen, war es wichtig sich mit diesen klinischen und pathologischen Veränderungen genau auseinanderzusetzen. Hier sollten sämtliche bereits bekannte Aspekte der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie berücksichtigt werden. Im Grunde konnte man davon ausgehen, dass die Herzveränderungen der transgenen Mäuse denen einer myogenen, dekom kompensatorischen Dilatation am nächsten kamen. Im Fall der in dieser Arbeit

untersuchten transgenen Herzen waren alle Anzeichen für eine chronische Dilatation (sackförmiges Herz mit stumpfer Spitze) gegeben. Eine solche myogene Dilatation kann sich aus einer Degeneration des Myokards (Myodegeneratio cordis) entwickeln. Die Degeneratio cordis kommt durch Vergiftungen, Hypoxidosen oder Mangelzustände als ZENKERSche Degeneration zustande (Dahme E., Weiss E., 1999; Meurer D., 1999). Dies beginnt mit einer Veränderung im Sarkoplasma und den Muskelfibrillen- und filamenten, die zu einer feintropfigen Verfettung (Fettphanerose), einer trüben Schwellung des Sarkoplasmas und zu einer hyalin-scholligen Entartung der Fibrillen führt. Makroskopisch erscheinen solche Herzen weiß-gelblich, wie diese der transgenen Mäuse. Insbesondere bei Hypoxidosen und gestörten Mitochondrienfunktionen kommt es, durch die nicht metabolisierten Fettsäuren zu einer feintropfigen Verfettung. Beim plötzlichen Herztod des Kalbes, zeigen sich neben den typischen histologischen Veränderungen, elektronenmikroskopisch veränderte Mitochondrien. Eine eingeschränkte Zellatmung scheint eine Rolle in der Entwicklung der Degeneratio cordis zu spielen. Nach Betrachtung der makroskopischen und histologischen Bilder (Abbildungen 18-23) der transgenen Mäuse fielen einige Parallelen auf. Die Herzen waren im gleichen Maße dilatiert und zeigten weißlich-gelbliche Auflagerungen. In den histologischen Bildern erkannte man den scholligen Zerfall der Herzmuskelzellen. In der elektronenmikroskopischen Betrachtung fielen Veränderungen der Mitochondrien und zerstörte Sarkomere (Abbildung 35) auf.

Allerdings fehlten zwei sehr wichtige Aspekte, die eine ZENKERSche Muskeldegeneration charakterisieren. Durch die hochgradige Myolyse kommt es zu einer resorptiven Entzündung mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, um die entstehenden Zelltrümmer abzubauen. In den histologischen Bildern der transgenen Mäuse wurden keine Entzündungsanzeichen gefunden. Im Gegenteil, es konnte gezeigt werden, dass die Herzmuskelzellen nicht durch Nekrose, sondern durch den programmierten Zelltod zugrunde gingen. Weiterhin fehlten jegliche Anzeichen einer Fettphanerose. Der Ersatz des Herzmuskelgewebes geschah vollständig durch Bindegewebe. Trotzdem gab es enorme Parallelen zur ZENKERSchen Muskeldegeneration. Da diese Erkrankungen in einem Zusammenhang mit Defiziten in Vitamin E und Selen stehen und dies wiederum Auswirkungen auf die mitochondriale β -Oxidation der Fettsäuren hat, könnte man vermuten, dass eine verminderte Sauerstoffversorgung (Hypoxie) und die degenerierten Mitochondrien auch in diesem Fall Einfluss auf die Entwicklung der Herzerkrankung genommen haben. Die beobachtete Apoptose der Herzmuskelzellen (siehe 3.9.) könnte durch die Freisetzung pro-

apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien (intrinsischer Weg) ausgelöst worden sein, nachdem diese sich innerhalb der Entwicklung der Erkrankung verändert hatten.

Nach Berücksichtigung sämtlicher pathologischer Aspekte könnte man folgende Pathogenese entwickeln: durch das Fehlen großer Anteile der extrazellulären Domänen 1 und 2 des Desmoglein 2-Proteins könnten die Desmosomen ihren Halt innerhalb der Glanzstreifen verloren haben (siehe 4.4). Die Zellen drifteten auseinander (siehe Abbildung 21-23) und der entstehende Hohlraum musste ausgefüllt werden, um die Mechanik des Herzens aufrecht zu erhalten. Es könnte zu einer Kapillarneubildung aus erhaltenen proliferierenden Endothelzellen gekommen sein. Die Zellen lagen als Angioblasten mit neuem Gefäßlumen vor. Es folgte eine weitere Differenzierung mit Bildung einer Basalmembran. Dieses primitive Gefäßmesenchym könnte als Ausgangsbasis für die Bindegewebsbildung gedient haben. Nach einiger Zeit entwickelten sich Fibroblasten aus den Mesenchymzellen, die sich zu Fibrozyten weiterentwickelten. Fibrin diente als Leitstruktur für die Bildung der Kollagenfasern. Die Kollagenfasern bildeten sich aus der Zusammenlagerung von Protofibrillen, die sich an den Bindegewebszellen, zusammensetzten. Mit zunehmender Metaplasie des Herzmuskelgewebes zu Bindegewebe könnten die einzelnen Herzmuskelzellen den Kontakt zueinander verloren haben und geschädigt worden sein. Daraus könnte eine schlechtere Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff resultiert haben, was die Zellatmung beeinträchtigt hat und zu einer Degeneration der Mitochondrien führte. Mitochondrien häufen sich, als Energielieferanten der Zelle in Bereichen des höchsten Energiebedarfs. Die innere Mitochondrienmembran (Crista mitochondriales) trägt den größten Teil der Energiegewinnung durch die Bildung von ATP. Die Anzahl der Leisten der Membran ist Ausdruck der Stoffwechselintensität einer Zelle und ist in den stoffwechselintensiven Herzmuskelzellen dicht gepackt. Es wurde beobachtet, dass die Mitochondrien der DSG2^{delE4-E6}-Mutanten weitaus weniger Leisten enthielten, als die Mitochondrien der wildtypischen Kontrollen (Abbildung 35). Man konnte davon ausgehen, dass die Stoffwechselaktivität und die Energiegewinnung in den transgenen Herzen stark beeinträchtigt waren. Durch die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus den geschädigten Mitochondrien könnten die Zellen angeregt worden sein, Apoptose zu begehen und zugrunde zu gehen. Diese Theorie berücksichtigt natürlich nur die pathologischen Veränderungen der transgenen Tiere. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass an der Entstehung der Erkrankung ARVC verschiedene Signalwege beteiligt waren (siehe 1.5.4.). In den folgenden Kapiteln soll auf diese Signalwege eingegangen werden.

4.2. Signalwege in der Entwicklung von Herzerkrankungen

Nachdem im vorangegangenen Kapitel lediglich die pathologischen Aspekte berücksichtigt worden sind, wird nun auch die mögliche Beteiligung von Signaltransduktionswegen an der Entstehung der Herzveränderungen in Betracht gezogen. In der Vergangenheit wurden bereits Signalwege identifiziert, die nachweislich an der Entstehung von Herzerkrankungen beteiligt sind (Mudd and Kass, 2008). Dabei kann eine Vielzahl an Signalwegen in die Entwicklung von Herzerkrankungen involviert sein und sich gegenseitig überschneiden (Mudd and Kass, 2008). Zelloberflächenrezeptoren werden durch Ligandenbindung oder einen mechanischen Stimulus aktiviert. Dies führt wiederum zur Aktivierung von Proteinkinasen und Phosphatasen, die für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind. Das Resultat ist ein Wechsel der zellulären Architektur, Größe, Gestalt und molekularen Regulation. Innerhalb dieser Signalkaskaden gibt es sogenannte Knotenpunkte, an denen mehrere Signalwege zusammen- und auseinander laufen. Da es sich insgesamt um eine Vielzahl an Enzymen und Transkriptionsfaktoren handelt, soll hier nur auf einige Faktoren eingegangen werden, die bei der Entstehung der veränderten Herzen der transgenen Mäuse eine Rolle spielen könnten. Die Proteinkinase p38 MAPKs (mitogen-activated protein kinase) gehört zu den MAP-Kinasen, die in einer Kaskade von Phosphorylierungen aktiviert werden und in den Zellkern wandern, um durch die Aktivierung einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren die Transkription von Zielgenen zu aktivieren, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung regulieren. Ausgelöst werden diese Signalkaskaden durch „Mitogene“, wie Tumornekrosefaktoren, Interleukine und reaktive Superoxide. Die Proteinkinase p38 wurde bereits im Zusammenhang mit der Entstehung von Fibrosen und der Entwicklung einer kardialen Dysfunktion untersucht (Mudd and Kass, 2008). Sie aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor GATA4 (GATA-binding protein 4), der als Antwort auf Stress-Signale für den kardialen Umbau verantwortlich ist. GATA4 scheint eine Rolle in der Entwicklung von Herzerkrankungen zu spielen, da eine Deletion des entsprechenden Gens zu einer kardialen Dysfunktion, Dilatation der Kammern und erhöhter Apoptose geführt hat (Mudd and Kass, 2008). Interessant für diesen Fall war die Entdeckung insbesondere deshalb, weil in Western Blot-Analysen aus Gesamtproteinextrakten der transgenen Mäuse mit Antikörpern gegen p38 MAPK und p38^P MAPK, ein Abfall der Konzentration derselben Enzyme in den über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten und den konstitutiven

DSG2^{delE4-E6}-Mutanten beobachtet wurden (Abbildung 39, 40). Daraus ließ sich schließen, dass in den Mutanten der p38 MAP-Kinase-Signalweg herunter reguliert wurde und die entsprechenden Transkriptionsfaktoren, wie GATA4 nicht aktiviert wurden, was eine erhöhte Apoptose und eine gestörte Zellwachstumsregulation zur Folge gehabt haben könnte.

Der p38 MAPK-Signalweg wird darüber hinaus durch die Anwesenheit von ROS (reactive oxygen species) aktiviert. Diese Superoxide wiederum werden durch eine Vielzahl von Signalwegen getriggert. Ein Beispiel dafür ist die Rolle der Nitrit-Oxid Synthase 3 (NOS3), die unter physiologischen Umständen vor oxidativer Cytotoxizität, abnormalem Zellwachstum und Fibrose schützt. Unter oxidativen Bedingungen kann der Elektronentransfer von der reduzierenden Domäne zur oxidierenden Domäne gestört sein, was zur Bildung von Superoxiden führt. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass im erkrankten Herzen die Energieversorgung nicht mehr hauptsächlich durch freie Fettsäuren, sondern mehr durch Glukose gedeckt wird. Dieser Umstand ist an eine Abnahme der Produktion von transkriptionalen Kofaktoren wie PGC1 α gekoppelt, die wichtige Regulatoren der Mitochondrienfunktion sind. Der Umstand, dass die Mitochondrien der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten degeneriert waren, sprach für einen gestörten Elektronentransfer und eine veränderte Energieversorgung in den transgenen Herzen, was zur Bildung von Superoxiden geführt haben könnte. Dafür spricht auch, dass in erkrankten Herzen die Aktivität des Enzyms Kreatinkinase, welches die Umsetzung von Phosphokreatin und ADP zu Kreatin und ATP katalysiert, herabgesetzt ist (Mudd and Kass, 2008).

Für die Erkrankung ARVC ist der β -Catenin/Wnt-Signalweg die bislang einzige genauer untersuchte Signalkaskade (Garcia-Gras et al., 2006). Den Zelladhäsionsmolekülen kommen nicht nur adhäsive Eigenschaften zu, sondern sie spielen auch eine Rolle als Regulatoren, innerhalb der Signalwege. Sie dienen unter anderem als Schlüsselregulatoren in der Myozytendifferenzierung, Herzentwicklung und der Aufrechterhaltung der aktuellen zellulären Architektur. Das klassische Adapterprotein β -Catenin spielt eine entscheidende Rolle im β -Catenin/Wnt-Signalweg (1.7.), indem es zum Einen als Strukturprotein in den Adhärenzverbindungen dient und zum Anderen über die Verknüpfung mit dem Transkriptionsfaktor Tcf/LEF zu einer Komplexbildung und zur Aktivierung von Zielgenen, wie Cyclin D1 führt. Wie schon in 1.7. erwähnt, sind diese Zielgene für die Zellwachstumsregulation, Zellproliferation und Apoptose zuständig. Auch das desmosomale Protein Plakoglobin spielt eine Rolle im Wnt-Signalweg. Es scheint die Bindung an den Transkriptionsfaktor Tcf/LEF und die Kerntranslokation von β -Catenin zu beeinflussen (siehe

1.7.); (Ben-Ze'ev et al., 2000; Garcia-Gras et al., 2006; MacRae et al., 2006; Simcha et al., 1998; Zhurinsky et al., 2000). Da die Untersuchung dieses Signalwegs bei Desmoplakin-defizienten Mutanten (Garcia-Gras et al., 2006) im Zusammenhang mit der Erkrankung ARVC bereits Ergebnisse geliefert hat (Garcia-Gras et al., 2006), sollten in dieser Arbeit die Proteine β -Catenin und Plakoglobin im Hinblick auf ihre Rolle in der Entstehung der Erkrankung und ihre eventuelle Signalwirkung betrachtet werden. In der Tat zeigte die Western-Blot-Analyse (Abbildung 38) der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten eine erhöhte Konzentration an Plakoglobin. Da Desmoglein 2 über Plakoglobin und Desmoplakin mit den Intermediärfilamenten verknüpft wird, könnte man davon ausgehen dass, im Falle eines geschädigten Desmosoms das Protein Plakoglobin vermehrt abgebaut wird und seine Konzentration somit abfällt. Die Tatsache, dass die Plakoglobin-Konzentration in den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten stieg, ließ vermuten, dass diesem Protein weitere Funktionen zukamen, als lediglich die der Zelladhäsion. Darüber hinaus kommt Plakoglobin nicht nur in den Desmosomen, sondern auch in anderen Adhärenzverbindungen vor. Es könnte durch die Abnahme der Desmoglein 2-Konzentration zu einer starken Schädigung der Desmosomen gekommen sein, sodass deren Funktion in den Glanzstreifen durch andere Adhärenzverbindungen übernommen werden mussten. Da Plakoglobin auch ein Bestandteil der Faszia adhaerens ist, könnte diese Tatsache die erhöhte Konzentration erklären.

Während die Immunfluoreszenz-Analysen der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten von β -Catenin ein unverändertes Signal zeigten, bildete sich in der Western-Blot-Analyse von β -Catenin eine deutlich schwächere Bande (Abbildung 38). Diese Ergebnisse könnten sich folgendermaßen erklären lassen: durch die erhöhte Konzentration von Plakoglobin und die verminderte Stabilität der Glanzstreifen könnte es zu einer Verdrängung von β -Catenin aus dem Transkriptionskomplex und zu einer gesteigerten Rekrutierung in die Adhärenzverbindungen kommen, um die geschädigten Glanzstreifen zu stabilisieren. Dadurch würde der Anteil an β -Catenin am Gesamtproteinextrakt abfallen und es käme zu einem gleichbleibenden erhöhten Signal in der Immunfluoreszenz-Analyse.

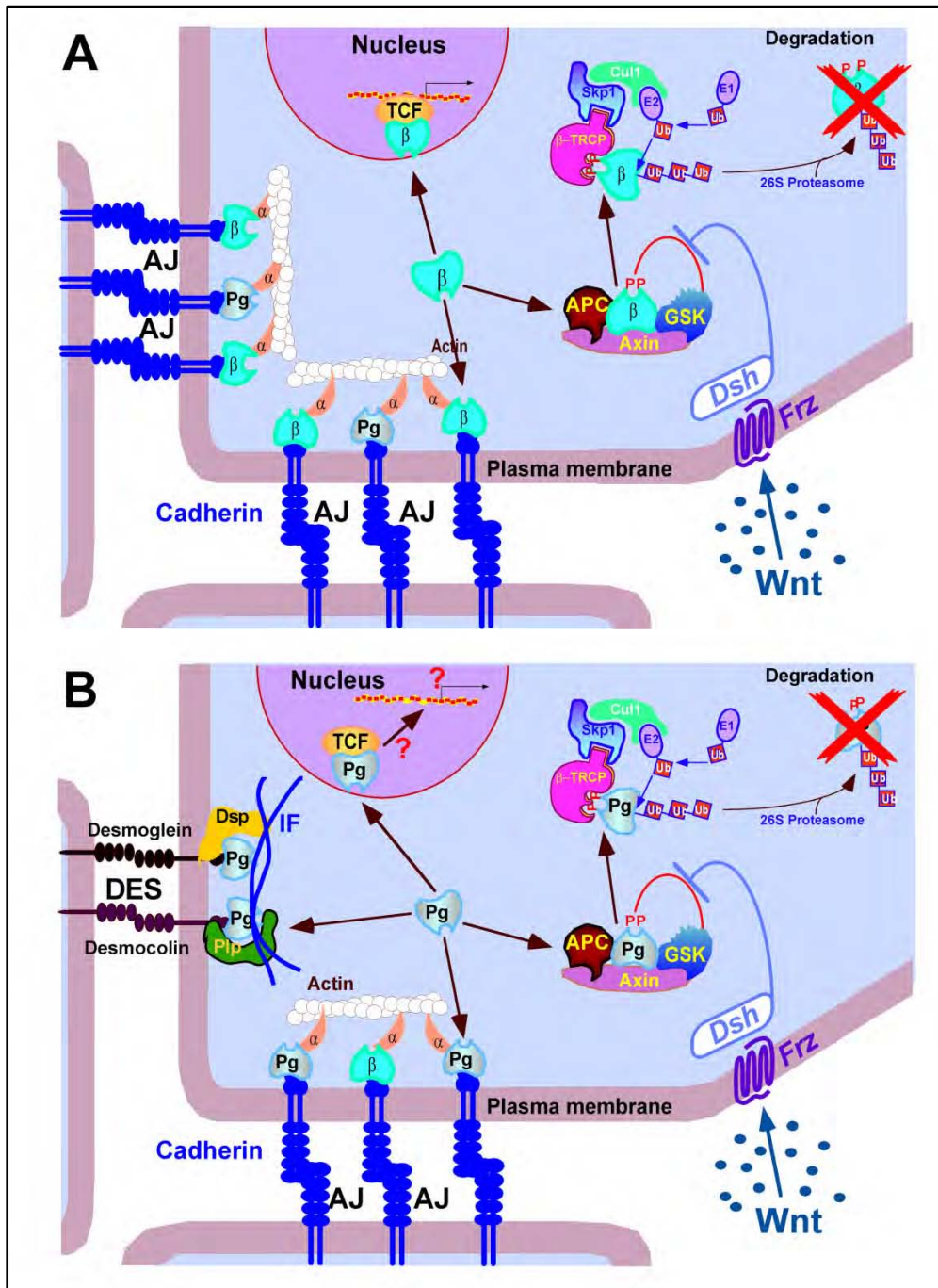


Abbildung 40: Schema des β -Catenin/Wnt-Signalwegs und die mögliche Rolle von Plakoglobin (Zhurinsky et al., 2000): (A) β -Catenin und Plakoglobin in ihrer adhäsiven Rolle in den Adhärenz junctions und Desmosomen, ohne Wnt wird β -Catenin im Degradationskomplex abgebaut. Nach Bindung von Wnt wird dieser Komplex inhibiert und β -Catenin kann in den Kern translozieren, wo es durch die Bindung an den Tcf/LEF-Transkriptionsfaktor zur Aktivierung von Zielgenen führt. (B) Plakoglobin kann auch an den gleichen Transkriptionsfaktor binden, die Transaktivierung der entsprechenden Zielgene wird noch kontrovers diskutiert. **AJ:** Adhärenz junction (Fascia adherens), **DES:** Desmosom, **Pg:** Plakoglobin, **β :** β -Catenin

Die Rolle von Plakoglobin im β -Catenin/Wnt-Signalweg wird kontrovers diskutiert. Fest steht, dass die Bindung von Plakoglobin an den Tcf/LEF-Transkriptionsfaktor nicht im

gleichen Maße effektiv ist, wie die Bindung mit β -Catenin (Ben-Ze'ev et al., 2000; Garcia-Gras et al., 2006; MacRae et al., 2006; Simcha et al., 1998; Zhurinsky et al., 2000). Man könnte also davon ausgehen, dass es im Falle einer Verdrängung von β -Catenin aus dem Komplex durch Plakoglobin zu einer Suppression des Signalwegs käme und die Zellwachstumsregulation gestört würde. Im Anschluss könnte es zu einer falschen Zellwachstumssteuerung und zur Apoptose kommen. Garcia-Gras hat diese These in seiner Arbeit mit Desmoplakin-defizienten Mausmutanten durch die Analyse der Zielgene des β -Catenin/Wnt-Signalwegs untermauert. Es wurde eine verminderte Aktivität von Cyclin D1 und c-Myc in den Mutanten mit ausgeprägtem Phänotyp nachgewiesen (Garcia-Gras et al., 2006). In dieser Arbeit zeigte sich in den über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten und den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten eine erhöhte Konzentrierung von Cyclin D1 (Abbildung 36). Diese Tatsache könnte in einem Widerspruch zu den Ergebnissen von Garcia-Gras stehen, da man davon ausgehen müsste dass es im Falle, der in dieser Arbeit generierten und untersuchten Mutanten zu einer erhöhten Aktivierung des β -Catenin/Wnt-Signalwegs kam. Die transgenen Mäuse von Garcia-Gras sind allerdings an einer ganz anderen Stelle mutiert, als die Tiere in dieser Arbeit. Vielleicht haben die Mutationen im DSP-Gen völlig andere Auswirkungen auf die Transkription von Cyclin D1 als die Dsg2-Mutation. Da sich aber die Phänotypen der transgenen Tiere beider Experimente stark ähneln, scheinen die erhöhte Aktivität, sowie die Suppression des β -Catenin/Wnt-Signalwegs zu einer erhöhten Apoptose und zu einer veränderter Zelldifferenzierung zu führen.

Da die stärksten Veränderungen innerhalb der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten auftraten und diese die Mutation in der Keimbahn vererbten, könnte es bereits in der Herzentwicklung zur entsprechenden Ausprägung gekommen sein. Das Herz entwickelt sich aus zwei Hauptfeldern („first heart field“ und „second heart field“), die wiederum in eine Reihe von Verzweigungen eingeteilt sind. Aus jedem Bereich entsteht eine andere Komponente des späteren Herzens. Jeder dieser Bereiche wird durch unterschiedliche Moleküle reguliert. Dies könnte erklären, warum eine Mutation nur einen bestimmten Zellstamm beeinflusst und ein Defekt deshalb nur in einer bestimmten Herzstruktur vorkommt (Bruneau, 2008), wie im Fall von ARVC, wo hauptsächlich der rechte Ventrikel betroffen ist.

4.3. Die direkte Rolle von Desmoglein 2 in der Apoptose

Es gibt viele Wege, über die die Apoptose ausgelöst wird, aber der Todesrezeptorweg und der mitochondriale Weg sind die bislang meist-erforschten Wege. Beide führen zur Aktivierung

der Caspase-Reihe, die zur DNA-Fragmentierung führt. Die fragmentierten Zelltrümmer werden durch Makrophagen abgebaut, ohne eine Entzündungsreaktion oder eine Antikörperbildung zu induzieren. Der Todesrezeptorweg wird über die Bindung verschiedener Liganden, wie Fas/CD9 an Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie (Todesrezeptoren) in der Plasmamembran ausgelöst. Beim mitochondriale Weg kommt es durch ein externes Signal zur Aktivierung von Proteinen der bcl-2-Familie und der bax-Subfamilie, was zu einer Anheftung dieses Faktoren an die Mitochondrienmembran und somit zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, wie Cytochrom c führt. Cytochrom c bindet an das cytosolische Protein Apaf-1 und aktiviert damit die Caspasen.

Bislang wurde die Rolle des mutierten Proteins Desmoglein 2 an der Signaltransduktion außer Acht gelassen. Da die Ergebnisse dieser Arbeit aber enorme Veränderungen im Desmoglein2-Gen und Protein zeigten, ist es besonders interessant dieses hier mutierte Protein in einen direkten Zusammenhang mit der Entstehung des Phänotyps zu bringen. In den Kapiteln 3.2. bis 3.4. konnte gezeigt werden, dass in beiden Mutanten ein erfolgreich rekombiniertes DSG2-Gen vorlag und dass in beiden Fällen auch eine verkürzte, rekombinierte mRNA synthetisiert wurde. Das wildtypische Dsg2-Protein konnte in der konditionalen Mutante nach 5 Wochen Tamoxifenbehandlung nur in geringfügiger Konzentration und in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante überhaupt nicht mehr detektiert werden. Die Frage ist, was mit der verkürzten, fehlerhaften mRNA passierte. Entweder könnte es zu einem Abbau der mutierten mRNA oder zur Synthese eines verkürzten Desmoglein 2-Proteins kommen. In den Western Blot-Analysen (Abbildung 17) der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten konnte kein wildtypisches Dsg2 mehr detektiert werden. Die Immunfluoreszenz-Analysen zeigten jedoch eine geringfügige Desmoglein 2-Markierung, sodass die Bildung eines mutierten Proteins wahrscheinlich war. Da aber der Desmoglein 2-Nachweis auch in den Immunfluoreszenz-Analysen sehr gering war, konnte man davon ausgehen, dass es nur noch in einem sehr reduzierten Maße zum Einbau des fehlerhaften Proteins in die Desmosomen kam und es sehr schnell abgebaut wurde.

Man könnte nun eine Theorie entwickeln, in der das fehlerhafte Desmoglein 2-Protein selbst über das Eingreifen in Signalkaskaden zur Auslösung der Apoptose führt. Es gibt bereits eine Arbeit, die die Wirkung von Desmoglein 2 auf die Apoptose von intestinalen Epithelien untersucht (Nava et al., 2007). Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Desmoglein 2 einen direkten Einfluss auf die Apoptose nimmt. Zum Einen führte eine Runter-Regulation von Desmoglein 2 zu einem insgesamt Abfall der Apoptose und zum Anderen führte dies

zu einer geringeren Spaltung des Apoptose-Enzyms Caspase 3. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine Spaltung des Desmoglein 2-Proteins mit Bildung eines Dsg 2-C-Terminus-Spaltproduktes zur Hochregulierung der aktiven Caspase 3 in den Zellen und zu einem Anstieg der Apoptose führte (Nava et al., 2007). Die Spaltung von Desmoglein 2 und die Bildung des C-Terminus-Produktes sensibilisieren die Zellen Apoptose zu begehen. Gleichzeitig wurde mit Beginn der Apoptose ein Anstieg der Plakoglobinkonzentration verzeichnet. Nava konnte zeigen, dass es durch proteolytische Spaltung zur Bildung des C-Terminus-Stückes kommt, da die Fraktion des gespaltenen Dsg 2-Proteins in Western Blot-Analysen nach Apoptoseinduktion anstieg und die Gesamtkonzentration von Desmoglein 2 abfiel. Letztendlich lässt dies auf eine direkte Wirkung von Desmoglein 2 in der Apoptose schließen. Sie bezieht sich zwar lediglich auf die intestinalen Epithelzellen, allerdings ist eine ähnliche Rolle in anderen Zellarten denkbar. Wenn man diese Ergebnisse auf die Ergebnisse dieser Arbeit bezieht, könnte man spekulieren, dass es eventuell durch das geschädigte Desmoglein 2-Protein direkt zu einer Auslösung der Apoptose kam. Vielleicht entstanden beim Abbau dieses fehlerhaften Proteins durch proteolytische Spaltung Produkte, wie das C-Terminus-Stück in der Arbeit von Nava, die die Apoptose der Herzmuskelzellen direkt ausgelöst haben. Eine weitere Parallele der Ergebnisse von Nava mit dieser Arbeit ist die Erhöhung der Plakoglobin-Konzentration, gleichzeitig mit dem Auftreten von Apoptose. Mittlerweile wurden hier viele Möglichkeiten entwickelt, die die Auslösung der Apoptose der Herzmuskelzellen erklären können. Um diese Theorien weiter zu beweisen, müsste man den einen oder anderen Weg genauer untersuchen. Eine der Hauptergebnisse dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass die Veränderungen des Herzens durch den Tod der Kardiomyozyten durch Apoptose zustande kamen. Und wenn man diese Beobachtung auf die Erkrankung ARVC überträgt, würde es den Verdacht bekräftigen, dass Apoptose eine große Rolle in der Entstehung von Herzerkrankungen spielt. Diese Tatsache kann man für therapeutische Ansätze nutzen (Shiraishi et al., 2004).

4.4. Auswirkungen der DSG2-Mutation auf die desmosomale Adhäsion

Den, in dieser Arbeit untersuchten Desmoglein 2-Mutanten fehlen durch die Deletion der Exone 4-6 wichtige Strukturen für die Zelladhäsion. Dem Protein fehlen große Bereiche der extrazellulären Domänen 1 und 2 und eine Kalziumbindungsstelle. Beide Strukturen sind, nach den bislang entwickelten Theorien zur Cadherininteraktion von großer Bedeutung für die

Zelladhäsion. Allen Cadherinen gemeinsam sind die vier hochkonservierten extrazellulären Domänen (EC1-EC4), die über vier Kalziumbindungsabschnitte miteinander verknüpft sind. Jeder Kalziumbindungsabschnitt bindet jeweils drei Kalziumionen (Koch et al., 1999). Durch die Zusammenlagerung mehrerer β -Falblattstrukturen und zweier kurzer α -helikaler Bereiche entsteht eine Tertiärstruktur, die die Einlagerung von Ca^{2+} -Ionen zwischen die EC-Domänen ermöglicht. Durch die Kalziumeinlagerung wird das Cadherin in seiner Form stabilisiert und nimmt eine gebogene Konformation ein (Boggon et al., 2002). In sämtlichen Theorien wird den hochkonservierten Bereichen der EC1-Domäne, dem Tryptophanrest (W2) und der konservierten HAV-Sequenz eine Hauptbeteiligung an der Zelladhäsion zugemessen. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Theorien über die Ausbildung von *cis*- und *trans*-Dimeren und der Bedeutung des Tryptophans für die Adhäsion. *Cis*-Interaktionen sind für die Bildung von Dimeren innerhalb der Zellmembran verantwortlich und *trans*-Interaktionen für die adhäsiven Eigenschaften zwischen Cadherinen benachbarter Zellen (Boggon et al., 2002). Während bei der einen Betrachtung von einer Bindung des W2 in die hydrophobe Tasche der EC1-Domäne des Partnermoleküls ausgegangen wird (*strand dimer interface*); (Shapiro et al., 1995), postuliert eine andere Untersuchung die direkte Ausbildung von EC1-*trans*-Dimeren, durch den Austausch von W2, für die eine *cis*-Interaktion nicht notwendig ist. Durch die Krümmung der extrazellulären Domänen kommt es im Anschluss, durch die Bindung der EC1-Domäne an die EC2-Domäne eines benachbarten Moleküls derselben Zelle automatisch zu einer *cis*-Interaktion (Abbildung 2); (Boggon et al., 2002). Beide Theorien gehen davon aus, dass sich die extrazellulären Domänen der Cadherine im Extrazellularspalt in einer gebogenen Konformation über *cis*- und *trans*-Interaktionen anordnen. Dabei bildet die Spitze der EC1-Domäne eine *trans*-Interaktion mit der EC1-Domäne der benachbarten Zelle. Die Aminosäure Tryptophan (W2) bindet gleichzeitig in die hydrophobe Tasche des Partnermoleküls. Da den Desmoglein 2-Mutanten große Teile der extrazellulären Domäne 1 fehlen, besitzen sie keine HAV-Sequenz mehr, die die hydrophobe Tasche bilden kann. Die Aminosäure Tryptophan und die Spitze der EC1-Domäne wurden nicht entfernt. Geht man von den oben beschriebenen Theorien aus, müsste bei den Mutanten, durch die Deletion der hydrophoben Tasche die *trans*-Interaktion erheblich beeinträchtigt werden. Da auch die, an der *cis*-Interaktion beteiligten Aminosäuren aus dem Desmoglein 2-Protein deletiert wurden, dürfte keine potente *strand dimer interface* (Shapiro et al., 1995) zustande kommen. Gerade die Herzmuskelzellen sind einer starken mechanischen Beanspruchung ausgesetzt. Dies erfordert eine besondere Flexibilität der desmosomalen Adhäsion. Diese Flexibilität ergibt

sich aus der Blattfeder-artigen gebogenen Konformation der extrazellulären Cadherindomänen. Durch die Verkürzung des extrazellulären Proteinanteils könnte sich diese Konformation ändern und die Flexibilität eingeschränkt werden. Die extrazellulären Domänen könnten von einer flexiblen, gebogenen Konformation in eine starre, gerade Konformation übergehen, die letztendlich der mechanischen Belastung nicht mehr standhalten kann. Diese Theorien gehen von einer alleinigen Beteiligung der EC1-Domänen an der Adhäsion aus. Anders sieht der Fall aus, wenn man die Überlappung mehrerer EC-Domänen in Betracht zieht (Sivasankar et al., 2001; Zhu et al., 2003). Es gibt Untersuchungen, die davon ausgegangen sind, dass die EC1-Domäne der einen Zelle nicht nur an die EC1-Domäne des *trans*-interagierenden Cadherins, sondern auch an die EC3-bzw. EC5-Domäne des Interaktionspartners bindet (Sivasankar et al., 1999; Zhu et al., 2003). Durch die stärkere Überlappung wäre eine stärkere Adhäsion möglich. Würde man von dieser Theorie ausgehen, müssten die Auswirkungen der Mutation geringer ausfallen, als bei den beiden oben genannten Theorien. Die Beteiligung mehrerer EC-Domänen an der Zelladhäsion müsste das Fehlen großer Teile der EC1-Domäne ausgleichen. Aufgrund des starken Phänotyps der Mutanten kann man davon ausgehen, dass der EC1-Domäne und der HAV-Sequenz eine enorme Bedeutung für die Bildung der Cadherininteraktion zukommt. Diese Tatsache unterstützt die ersten Theorien, die eine *trans*-Interaktion der EC-Domänen postulieren. Um die Defekte der desmosomalen Adhäsion auf molekularem Niveau genauer untersuchen zu wollen, sind weitere Experimente notwendig.

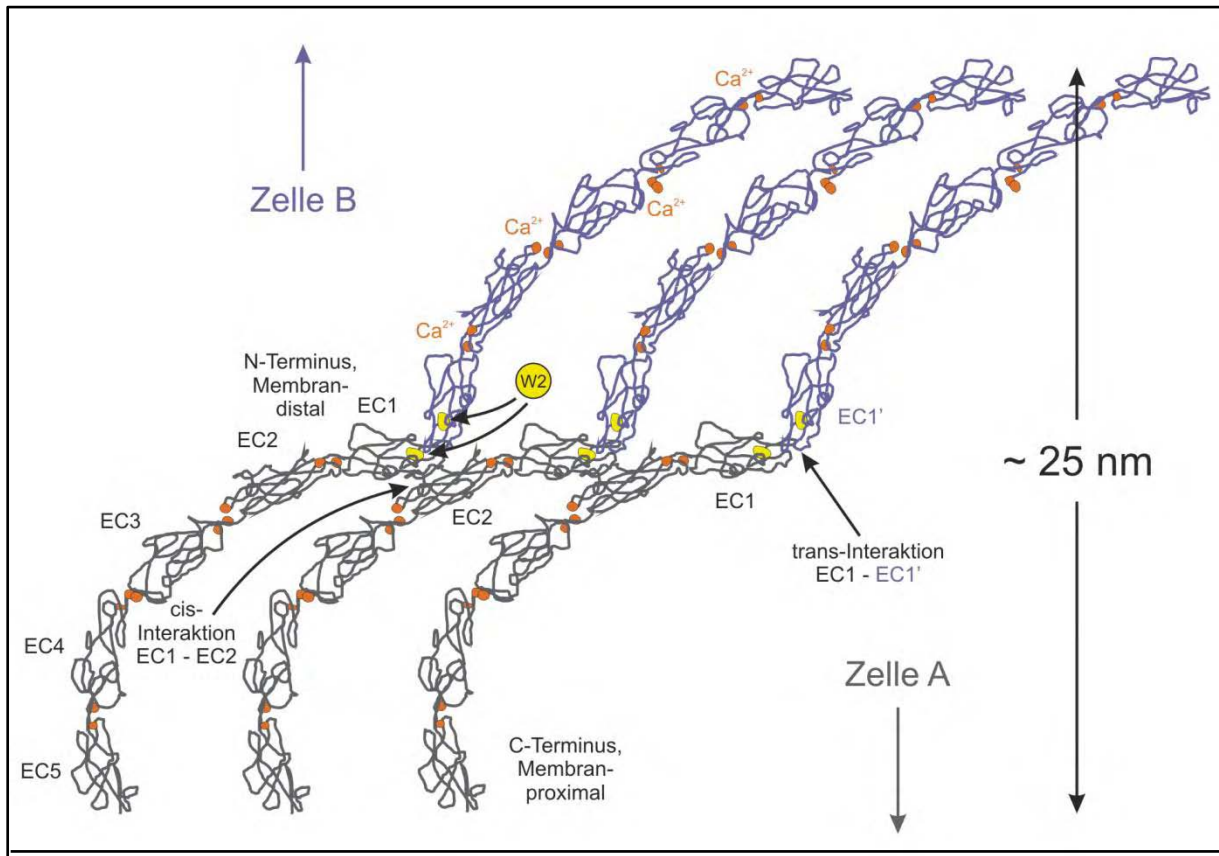


Abbildung 41: Interaktion der extrazellulären Domänen von C-Cadherinen im Interzellularspalt: Benachbarte Cadherinmoleküle einer Zelle bilden über ihre extrazellulären Domänen EC1 und EC2 *cis*-Interaktionen miteinander aus. Die EC1-Domäne eines Cadherins von Zelle A interagiert in *trans* mit einer EC1'-Domäne der Zelle B. Zwischen den einzelnen Cadherindomänen versteifen koordinierte Kalziumionen die gebogene Konformation. Die Aminosäure Tryptophan an Position 2 begünstigt die *trans*-Dimerisierung der Moleküle durch Demaskierung der Interaktionsoberfläche in EC1. EC1 bis EC5: extrazelluläre Domänen (grau/violett); Kalziumionen: orange; Tryptophan2: gelb (entnommen aus Bastian Holthöfer; 2007 verändert nach (Boggon et al., 2002))

4.5. Murine Desmoglein 2-Mutanten – ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung von ARVC

Ziel dieser Arbeit war es, u.a. ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie zu etablieren. Um dieses Vorhaben zu erreichen, mussten die klinischen und pathologischen Ausprägungen der mutierten Tiere mit denen der humanen Erkrankung ARVC vergleichbar sein. Der Phänotyp der in dieser Arbeit generierten transgenen Tiere zeigte beträchtliche Parallelen zu dem von ARVC-Patienten. Die mutierten Tiere hatten analoge klinische Symptome, wie plötzlicher Bewusstseinsverlust und Dyspnoe. Ein Teil der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten wurde an der Rheinisch-Westfälisch Technischen Hochschule in Aachen klinisch untersucht. Im Elektrokardiogramm zeigten die Tiere Arrhythmien. Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass durch die

Abnahme von Connexin 43 in den Mutanten die Erregungsweiterleitung gestört wurde. Weiterhin offenbarten die mutierten Herzen enorme makroskopische Veränderungen (Rechtsherzdilatation, Ersatz durch Bindegewebe), die denen der ARVC-Patienten gleichen (Pilichou et al., 2006). Darüber hinaus zeigten die histologischen Untersuchungen identische Ausprägungen (Pilichou et al., 2006). Die in dieser Arbeit etablierten Desmoglein 2-Mutanten stellen ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie dar, da der Phänotyp der Mutanten mit dem von ARVC-Patienten vergleichbar ist. Zudem haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, dass dieses Tiermodell ein beträchtliches Potential zur weiteren Erforschung der Pathogenese der Erkrankung ARVC trägt.

5. Zusammenfassung

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine erbliche Herzerkrankung, die für den plötzlichen Herztod („sudden cardiac death“) junger Sportler verantwortlich gemacht wird. Klinisch zeigen betroffene Patienten Arrhythmien und eine vergrößerte rechte Herzkammer. Ursache ist der Ersatz der Herzmuskulatur durch Bindegewebe. Der Erkrankung liegen Mutationen in Genen zu Grunde, die für Komponenten der desmosomalen Zell-Zell-Kontakte kodieren. Desmosomen sind Bestandteil der Glanzstreifen des Herzens, die an der mechanischen Kopplung der Herzmuskelzellen beteiligt sind. Den desmosomalen Cadherinen Desmoglein 2 und Desmocollin 2 kommt dabei eine Schlüsselstellung zu. Es wird angenommen, dass diese Kalzium-abhängigen Zelladhäsionsmoleküle darüber hinaus zelluläre Differenzierung beeinflussen.

Da in DNA-Sequenzanalysen von ARVC-Patienten Mutationen im Desmoglein 2-Gen nachgewiesen werden konnten, sollten im vorliegenden Projekt Desmoglein 2-Mutanten in der Maus generiert werden, um ihre Auswirkungen auf Herzmuskeldifferenzierung und -funktion zu untersuchen. Dazu wurde auf Tiermodelle zurückgegriffen, bei denen die Exone 4-6 des Desmoglein 2-Gens durch Cre-Rekombinase-Erkennungsstellen flankiert sind (Allel DSG2^{loxP}). Mit Hilfe der Cre-Rekombinase können in diesen Tieren die Exone 4-6 gezielt entfernt werden (Allel DSG2^{delE4-E6}). Diese Exone kodieren für Abschnitte der extrazellulären Domänen 1 und 2 des Desmoglein 2-Proteins, die an der Kalzium-abhängigen Zelladhäsion beteiligt sind. Zum einen wurde ein Mausstamm etabliert, in dem sich die Genmutation ausschließlich im Herzmuskel induzieren ließ. Zum anderen wurde eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante generiert, um die Auswirkungen der Mutation auf die Herzentwicklung zu beurteilen.

In beiden transgenen Stämmen konnte eine erfolgreiche Rekombination des Desmoglein 2-Gens und die Synthese einer mutierten mRNA nachgewiesen werden. Analysen des Desmoglein 2-Proteins ergaben eine starke Konzentrationsabnahme in den Mutanten. Die makroskopischen Untersuchungen zeigten, dass zwar normale Herzen entstehen, sich im Laufe des Lebens aber eine deutliche Herzvergrößerung und narbige Einziehungen entwickeln. In histologischen Untersuchungen der transgenen Herzen fanden sich eine deutliche Bindegewebsvermehrung und untergehende Herzmuskelzellen. Es stellte sich heraus, dass der Untergang der Herzmuskelzellen durch Apoptose herbeigeführt wird.

Immunfluoreszenzanalysen von den Desmosomenkomponenten Plakoglobin, Plakophilin 2 und Desmoplakin als auch von Komponenten anderer kardialen Zelladhäsionsstrukturen (β -Catenin, N-Cadherin) ergaben keine deutlichen Fehl- oder Umverteilungen. Die Konzentration des Gap junction-Polypeptids Connexin 43 war jedoch deutlich in den Glanzstreifen der Mutanten verringert. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten weiterhin einen starken Abfall der Desmosomenzahl in den Glanzstreifen, degenerierte Mitochondrien und zerstörte Sarkomere. Die in Immunoblots beobachtete starke Zunahme der Cyclin D1-Konzentration und Abnahme der p38/p38 Konzentration deuten auf eine Beteiligung des β -Catenin/Wnt-Signalwegs und des p38 MAPK-Signalwegs an der Entstehung der Herzveränderungen hin.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der Exone 4-6 des Desmoglein 2-Gens Herzmuskelveränderungen hervorruft, die typisch für ARVC sind. Die neu generierten Tiermodelle eignen sich daher hervorragend für weitere pathophysiologische Untersuchungen.

6. Summary

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a hereditary heart disease that is responsible for sudden cardiac death among young athletes. Clinically, these patients present arrhythmia and enlarged right ventricles. Substitution of muscle tissue by connective tissue is a pronounced histopathological finding. The disease is caused by mutations in genes that encode components of desmosomal cell-cell contacts. Desmosomes are part of the intercalated discs which contribute to the mechanical attachment of cardiomyocytes. The desmosomal cadherins desmoglein 2 and desmocollin 2 are crucial for adhesion. It is further assumed that these calcium-dependent cell adhesion molecules also affect cellular differentiation.

Since DNA sequence analyses of ARVC patients identified mutations in the desmoglein 2 gene, desmoglein 2 mutant mice were generated to study the effects of this defect on differentiation and function of cardiac muscle. To this end recently established transgenic mice were used, in which exons 4-6 are flanked by cre recombinase recognition sites (allele DSG2^{loxP}). With the help of cre recombinase exons 4-6 can be selectively deleted resulting in allele DSG2^{delE4-E6}. These exons code for parts of the extracellular domains 1 and 2 of desmoglein 2 that are involved in calcium-dependent cell adhesion. Two mouse strains were established: (i) Conditional mutants for selective induction of desmoglein 2 mutation in cardiomyocytes and (ii) constitutive mutants to study the effect of the desmoglein 2 mutation on heart development.

Successful recombination of the desmoglein 2 gene was observed in both strains. Furthermore, mutated mRNA could be detected by RT-PCR and examination of desmoglein 2 protein expression revealed considerable reduction. Macroscopically, normal hearts formed but enlargement and scars developed over time after birth. Histologically, dramatic connective tissue increase and degeneration of cardiomyocytes was noted. The latter was due to apoptosis. Immunofluorescence analyses of the desmosomal plaque components plakoglobin, plakophilin 1 and desmoplakin and also of components of other cardiac cell adhesion structures (β -catenin, N-cadherin) did not reveal obvious mislocalization or missorting. The concentration of the gap junction component connexin 2, however, was significantly reduced in intercalated discs. Electron microscopy further showed a considerable decrease in the number of desmosomes within the intercalated discs, degenerating mitochondria and

destroyed sarcomeres. The significant increase in cyclin D1 and the decrease of p38/^pp38 detected in immunoblots suggest that the participation of the β -catenin/wnt and p38 signalling pathways in the development of ARVC-related cardiac deficiencies.

In summary, it could be shown that loss of exons 4-6 of the desmoglein 2 gene elicits dramatic alterations of the heart muscle which phenocopy in many respects ARVC. The newly generated strains are therefore suitable models for further pathophysiological investigations.

7. Literaturverzeichnis

- Antoniades, L., A. Tsatsopoulou, A. Anastasakis, P. Syrris, A. Asimaki, D. Panagiotakos, C. Zambartas, C. Stefanadis, W.J. McKenna, and N. Protonotarios. 2006. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by deletions in plakophilin-2 and plakoglobin (Naxos disease) in families from Greece and Cyprus: genotype-phenotype relations, diagnostic features and prognosis. *Eur Heart J.* 27:2208-16.
- Basso, C., E. Czarnowska, M. Della Barbera, B. Bauce, G. Beffagna, E.K. Wlodarska, K. Pilichou, A. Ramondo, A. Lorenzon, O. Wozniak, D. Corrado, L. Daliento, G.A. Danieli, M. Valente, A. Nava, G. Thiene, and A. Rampazzo. 2006. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J.* 27:1847-54.
- Ben-Ze'ev, A., M. Shtutman, and J. Zhurinsky. 2000. The integration of cell adhesion with gene expression: the role of beta-catenin. *Exp Cell Res.* 261:75-82.
- Berkowitz, P., P. Hu, S. Warren, Z. Liu, L.A. Diaz, and D.S. Rubenstein. 2006. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12855-60.
- Boggon, T.J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B.M. Gumbiner, and L. Shapiro. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science.* 296:1308-13.
- Borrmann, C.M., C. Grund, C. Kuhn, I. Hofmann, S. Pieperhoff, and W.W. Franke. 2006. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk. *Eur J Cell Biol.* 85:469-85.
- Bruneau, B.G. 2008. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature.* 451:943-8.
- Charpentier, E., R.M. Lavker, E. Acquista, and P. Cowin. 2000. Plakoglobin suppresses epithelial proliferation and hair growth in vivo. *J Cell Biol.* 149:503-20.
- Dokuparti, M.V., P.R. Pamuru, B. Thakkar, R.R. Tanjore, and P. Nallari. 2005. Etiopathogenesis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Hum Genet.* 50:375-81.
- Eshkind, L., Q. Tian, A. Schmidt, W.W. Franke, R. Windoffer, and R.E. Leube. 2002. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol.* 81:592-8.
- Fidler, L.M., G.J. Wilson, F. Liu, X. Cui, S.W. Scherer, G.P. Taylor, and R.M. Hamilton. 2008. Abnormal connexin43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 mutations. *J Cell Mol Med.*
- Franke, W.W., H. Schumacher, C.M. Borrmann, C. Grund, S. Winter-Simanowski, T. Schlechter, S. Pieperhoff, and I. Hofmann. 2007. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - III: assembly and disintegration of intercalated disks in rat cardiomyocytes growing in culture. *Eur J Cell Biol.* 86:127-42.
- Garcia-Gras, E., R. Lombardi, M.J. Giocondo, J.T. Willerson, M.D. Schneider, D.S. Khoury, and A.J. Marian. 2006. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 116:2012-21.

- Grossmann, K.S., C. Grund, J. Huelsken, M. Behrend, B. Erdmann, W.W. Franke, and W. Birchmeier. 2004. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol.* 167:149-60.
- Holthofer, B., R. Windoffer, S. Troyanovsky, and R.E. Leube. 2007. Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol.* 264:65-163.
- Koch, A.W., D. Bozic, O. Pertz, and J. Engel. 1999. Homophilic adhesion by cadherins. *Curr Opin Struct Biol.* 9:275-81.
- MacRae, C.A., W. Birchmeier, and L. Thierfelder. 2006. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: moving toward mechanism. *J Clin Invest.* 116:1825-8.
- Mallat, Z., A. Tedgui, F. Fontaliran, R. Frank, M. Durigon, and G. Fontaine. 1996. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med.* 335:1190-6.
- Markiewicz-Loskot, G., E. Moric-Janiszewska, M. Loskot, L. Szydlowski, A. Hollek, and L. Weglarz. 2007. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia:clinical study. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 12:181-4.
- Moric-Janiszewska, E., and G. Markiewicz-Loskot. 2007. Review on the genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Europace.* 9:259-66.
- Mudd, J.O., and D.A. Kass. 2008. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature.* 451:919-28.
- Nava, P., M.G. Laukoetter, A.M. Hopkins, O. Laur, K. Gerner-Smidt, K.J. Green, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2007. Desmoglein-2: a novel regulator of apoptosis in the intestinal epithelium. *Mol Biol Cell.* 18:4565-78.
- Pieperhoff, S., and W.W. Franke. 2007. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adhaerens junction components - late processes in mammalian heart development. *Eur J Cell Biol.* 86:377-91.
- Pilichou, K., A. Nava, C. Basso, G. Beffagna, B. Bauce, A. Lorenzon, G. Frigo, A. Vettori, M. Valente, J. Towbin, G. Thiene, G.A. Danieli, and A. Rampazzo. 2006. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation.* 113:1171-9.
- Rampazzo, A., G. Beffagna, A. Nava, G. Occhi, B. Bauce, M. Noiato, C. Basso, G. Frigo, G. Thiene, J. Towbin, and G.A. Danieli. 2003. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1 (ARVD1): confirmation of locus assignment and mutation screening of four candidate genes. *Eur J Hum Genet.* 11:69-76.
- Rampazzo, A., A. Nava, S. Malacrida, G. Beffagna, B. Bauce, V. Rossi, R. Zimbello, B. Simionati, C. Basso, G. Thiene, J.A. Towbin, and G.A. Danieli. 2002. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 71:1200-6.
- Sen-Chowdhry, S., M.D. Lowe, S.C. Sporton, and W.J. McKenna. 2004. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: clinical presentation, diagnosis, and management. *Am J Med.* 117:685-95.
- Sen-Chowdhry, S., P. Syrris, D. Ward, A. Asimaki, E. Sevdalis, and W.J. McKenna. 2007. Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression. *Circulation.* 115:1710-20.
- Shapiro, L., A.M. Fannon, P.D. Kwong, A. Thompson, M.S. Lehmann, G. Grubel, J.F. Legrand, J. Als-Nielsen, D.R. Colman, and W.A. Hendrickson. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature.* 374:327-37.
- Shiraishi, I., J. Melendez, Y. Ahn, M. Skavdahl, E. Murphy, S. Welch, E. Schaefer, K. Walsh, A. Rosenzweig, D. Torella, D. Nurzynska, J. Kajstura, A. Leri, P. Anversa, and M.A.

- Sussman. 2004. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 94:884-91.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D'Amico, R. Pestell, and A. Ben-Ze'ev. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5522-7.
- Simcha, I., M. Shtutman, D. Salomon, J. Zhurinsky, E. Sadot, B. Geiger, and A. Ben-Ze'ev. 1998. Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol.* 141:1433-48.
- Sivasankar, S., W. Brieher, N. Lavrik, B. Gumbiner, and D. Leckband. 1999. Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11820-4.
- Sivasankar, S., B. Gumbiner, and D. Leckband. 2001. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J.* 80:1758-68.
- Sohal, D.S., M. Nghiem, M.A. Crackower, S.A. Witt, T.R. Kimball, K.M. Tymitz, J.M. Penninger, and J.D. Molkentin. 2001. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res.* 89:20-5.
- Syrris, P., D. Ward, A. Evans, A. Asimaki, E. Gandjbakhch, S. Sen-Chowdhry, and W.J. McKenna. 2006. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet.* 79:978-84.
- Tsatsopoulou, A.A., N.I. Protonotarios, and W.J. McKenna. 2006. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia, a cell adhesion cardiomyopathy: insights into disease pathogenesis from preliminary genotype--phenotype assessment. *Heart.* 92:1720-3.
- Wencker, D., M. Chandra, K. Nguyen, W. Miao, S. Garantziotis, S.M. Factor, J. Shirani, R.C. Armstrong, and R.N. Kitsis. 2003. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest.* 111:1497-504.
- Williamson, L., N.A. Raess, R. Caldelari, A. Zakher, A. de Bruin, H. Posthaus, R. Bolli, T. Hunziker, M.M. Suter, and E.J. Muller. 2006. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J.* 25:3298-309.
- Zhu, B., S. Chappuis-Flament, E. Wong, I.E. Jensen, B.M. Gumbiner, and D. Leckband. 2003. Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys J.* 84:4033-42.
- Zhurinsky, J., M. Shtutman, and A. Ben-Ze'ev. 2000. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol.* 20:4238-52.

8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: vergleichende Übersicht von desmosomalen Haftkomplex und Adhärenzkontakten (Fascia adhaerens): Links-Desmosom: die desmosomalen Cadherine Desmoglein (rot) und Desmocollin (orange) überbrücken den Interzellularspalt und bilden mit ihren Interaktionsdomänen die zentrale Mittellinie (hellgrau). An die carboxyterminalen Domänen der desmosomalen Cadherine binden intrazellulär die Plaqueproteine Plakoglobin (violett) und Plakophilin (gelb) und bilden den äußeren desmosomalen Plaque (ODP). Diese Armadilloproteine interagieren wiederum mit Desmoplakin und verbinden so die membranständigen Proteine mit den lateral einstrahlenden Intemediärfilamenten. IDP: innerer desmosomaler Plaque; ODP: äußerer desmosomaler Plaque; PM: Plasmamembran; ML: Mittellinie Rechts-Adhärenzkontakt: Im Interzellularspalt lagern sich die klassischen Cadherine (rot) benachbarter Zellen kalziumabhängig aneinander, wobei die Aminosäure Tryptophan 2 (Trp2) eine wichtige Funktion übernimmt. Die carboxyterminalen Domänen der klassischen Cadherine tragen Bindestellen für die Armadilloproteine α -Catenin (blau) und p120 Catenin (orange). An deren Kopfdomänen binden die Brückenproteine β -Catenin oder γ -Catenin/Plakoglobin (grün), welche ihrerseits die Verbindung zu den Aktinfilamenten (hellrot) herstellen. (Holthöfer, 2007) 3
- Abbildung 2: Elektronen- mikroskopische Aufnahmen von Desmosomen in den Glanzstreifen des Herzens: A: Übersicht von Desmosomen und Fascia adhaerens B: vergrößerter Schnitt durch einen desmosomalen Haftkomplex (Strukturen farbig unterlegt) C: desmosomaler Haftkomplex ohne farbige Unterlegung; ODP: äußerer desmosomaler Plaque; IDP: innerer desmosomaler Plaque; PM: Plasmamembran (hellblau); ML: Mittellinie (gelb); Größenbalken: 100 nm..... 4
- Abbildung 3: Domänenstruktur des desmosomalen Cadherins Desmoglein 2: EC: extrazelluläre Domäne 1 bis 4; EA: extrazelluläre Ankerdomäne; TM: Transmembrandomäne; IA: intrazelluläre Ankerdomäne; ICS: intrazelluläres cadherinartiges Segment; L: Linkerdomäne; RUD: „repeat unit domain“; T: terminale Domäne; *: Kalziumbindetaschen; Pfeilmarkierung: Position von Tryptophan 2 (Hothöfer, 2007) 5
- Abbildung 4: Mutationen im Desmoglein 2-Gen, die bislang bei ARVC-Patienten gefunden wurden: Darunter eine Mutation (rote Umrandung) im Exon 5 (Pilichou et al., 2006)..... 7
- Abbildung 5: Konditional gewebespezifisches DSG2-Rekombinationssystem in der Maus: I.Integration von loxP-Rekombinasestellen in das Desmoglein2-Gen mittels homologer Rekombination (Exone 4-6 flankierend) II.Verpaarung der homozygoten DSG2^{loxP}-Mäusen mit Mäusen, die das MerCreMer-Rekombinationssystem unter der Kontrolle eines herzmuskelspezifischen Promotors tragen 14
- Abbildung 6: Deletion wichtiger Proteinbereiche von Dsg2 – vergleichende schematische Darstellung der DSG2-mRNA und der resultierenden Dsg2-Domänenstruktur des wildtypischen und rekombinierten Moleküls: es fehlen die Aminosäure-Reste für die hydrophobe Bindetasche, eine Ca²⁺-Bindestelle und die Haupt-N-Glykolisierungsstelle; insgesamt wird der extrazelluläre Anteil des Dsg2-Proteins enorm verkürzt; P: Prodomäne; EC1-EC4: extrazelluläre Cadherindomänen; EC1' und EC2': Fragmente der betroffenen extrazellulären Domänen nach erfolgter Rekombination; EA: extrazelluläre Ankerdomäne; TM: Transmembrandomäne; IA: intrazelluläre Ankerdomäne; ICS: intrazelluläres cadherinartiges Segment; LD: Linkerdomäne; RUD: „repeated unit domain“; T: terminale Domäne; Trp2: Aminosäure 2

des reifen Proteins (Tryptophan); *: Ca ²⁺ -Bindestellen; N-Glyk: N-Glykolisierungsstelle; E1-E15: Exone (Holthöfer, 2007).....	15
Abbildung 7: PCR-Analyse auf erfolgreiche Rekombination des DSG2-Lokus: es wurden Gewebeproben aus Herz, Dünndarm, Dickdarm, Leber und Schwanz aus der Gruppe, der über 5 aufeinanderfolgenden Tagen induzierten konditionalen Mutanten entnommen und mittels PCR-Analyse auf eine erfolgreiche Rekombination des DSG2-Allels (DSG2 ^{delE4-E6}) überprüft. Links: Wie zu erwarten, konnte lediglich ein PCR-Produkt des rekombinierten Lokus aus der DNA-Probe des Herzens detektiert werden. Rechts: Die DNA-Proben aus der Negativkontrolle zeigten in keinem Fall eine Rekombination des DSG2-Allels. Für die Kontrolle der Intaktheit der DNA diente der Nachweis von GAPDH.	48
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Generierung einer konstitutiven DSG2 ^{delE4-E6} -Mutante: (I) Damit die Exone 4-6 des DSG2-Gens induzierbar rekombiniert werden können, wurden diese von zwei loxP-Sequenzen flankiert (siehe 1.10.). Der zwischen den loxP-Sequenzen liegende DNA-Abschnitt wird von dem Enzym Cre-Rekombinase herausgeschnitten und die verbleibenden Sequenzen neu rekombiniert. (II) Homozygote Nachkommen dieser „gefloxten“ Tiere wurden mit homozygoten Trägern des ActCre-Rekombinase-Systems verpaart, welches durch einen β-Aktin-Promotor gesteuert wird. Nachkommen dieser Verpaarung exprimieren die Cre-Rekombinase bereits in der Keimbahn, sodass das DSG2-Gen ubiquitär rekombiniert wird. Diese Linie wurde verpaart, bis die Nachkommen homozygote Träger des „gefloxten“ Allels waren und das DSG2-Gen somit nur noch in rekombinierter Form vorlag (DSG2 ^{delE4-E6}).	50
Abbildung 9: PCR-Analyse des rekombinierten DSG2-Lokus: das Enzym Cre-Rekombinase schneidet den von loxP-Sequenzen flankierten Bereich der DNA heraus und rekombiniert das Gen neu, sodass ein PCR-Produkt von 860 bp entsteht. E2-E8: Exone 2-8.....	51
Abbildung 10: PCR-Analyse auf erfolgreiche Integration der 5'-loxP-Sequenz in den DSG2-Lokus: Durch die Bindungsstelle des Vorwärtsprimers (03-91) innerhalb der loxP-Sequenz wird die erfolgreiche Integration der loxP-Sequenzen in das DSG2-Allel durch diese PCR-Analyse nachgewiesen. E2-E8: Exone 2-8.....	52
Abbildung 11: Genotypisierung der F1-Generation der konstitutiven DSG2 ^{del E4-E6} -Mutante mittels PCR-Analyse: DSG2 ^{loxP} : Da der Einbau der loxP-Sequenzen in das DSG2-Gen mittels homologer Rekombination durchgeführt wurde (siehe 1.10.), ist der Integrationsort des Transgens bekannt und kann mit Hilfe spezifischer Primer genau überprüft werden. Die PCR-Analyse DSG2 ^{loxP} weist dieses „gefloxte“ DSG2-Gen nach und es bildet sich ein 925 bp umfassendes PCR-Produkt. DSG2 ^{delE4-E6} : Die erfolgreiche Rekombination des DSG2-Allels (DSG2 ^{delE4-E6}) wurde über eine weitere PCR nachgewiesen, bei der sich ein spezifisches, 860 bp umfassendes PCR-Produkt bildet. Im Falle der ersten Nachkommen (F1-Generation) von Tieren, die homozygot das „gefloxte“ DSG2-Allel tragen und Tieren, die homozygot die Erbinformation für die Cre-Rekombinase, unter der Kontrolle des β-Aktinpromotors enthalten, konnte eine erfolgreiche Rekombination des DSG2-Allels (DSG2 ^{delE4-E6}) für alle Nachkommen nachgewiesen werden. Das Fehlen eines PCR-Produktes für das „gefloxte“ DSG2-Allel (DSG2 ^{loxP}) bei allen Nachkommen bestätigt, dass die flankierte DNA-Sequenz des DSG2-Allels vollständig herausgeschnitten wurde. Die F1-Generation zeigte somit eine Vererbung nach den Mendel'schen Regeln und man konnte davon ausgehen, dass diese Tiere Träger eines wildtypischen und eines rekombinierten DSG2-Allels waren und somit heterozygot für den neu rekombinierten DSG2-Abschnitt (DSG2 ^{delE4-E6} /DSG2 ^{wt}). ActCre: Die PCR zum	

Nachweis der erfolgreichen Vererbung der Information für die Cre-Rekombinase (ActCre) wurde zusätzlich durchgeführt und zeigte ein PCR-Produkt für alle Nachkommen.....	53
Abbildung 12: PCR auf Zygotiezustand des loxP-Allels: durch die Insertion der 50 bp umfassenden loxP-Sequenz in das DSG2-Gen lässt sich das „ <i>gefloxte</i> “ Allel ($DSG2^{loxP}$) vom wildtypischen Allel ($DSG2^{wt}$) unterscheiden. Im Falle der Heterozygotie bildet sich ein PCR-Produkt für das wildtypische Allel (876 bp) und ein PCR-Produkt für das „ <i>gefloxte</i> “ Allel (925 bp). Im Fall von Homozygotie entsteht lediglich eine Bande für das „ <i>gefloxte</i> “ Allel.	54
Abbildung 13: Genotypisierung der F2-Generation mittels PCR-Analyse: Für die Nachkommen der Verpaarung aus der F1-Generation sind für das rekombinierte DSG2-Allel ($DSG2^{delE4-E6}$) heterozygote und homozygote Nachkommen und wildtypische Tiere im Verhältnis 1:1:2 zu erwarten. $DSG2^{loxP}$: Die PCR-Analyse zum Nachweis des „ <i>gefloxten</i> “ DNA-Abschnitts zeigt bei keinem Tier ein PCR-Produkt. Zygote loxP-Allel: Diese PCR-Methode diskriminiert zwischen wildtypischem DSG2-Allel (876 bp) und „ <i>gefloxtem</i> “ DSG2-Allel (925 bp). $DSG2^{delE4-E6}$: Diese PCR weist das rekombinierte DSG2-Allel nach. Heterozygote Tiere bilden ein PCR-Produkt für das rekombinierte DSG2-Allel ($DSG2^{delE4-E6}$) und ein PCR-Produkt für das wildtypische DSG2-Allel. Homozygote Tiere bilden lediglich ein PCR-Produkt für das rekombinierte DSG2-Allel. Wildtypische Nachkommen zeigen keine Rekombination und bilden ein Produkt für das wildtypische DSG2-Allel (876 bp).	55
Abbildung 14: Genotypisierung der F3-Generation mittels PCR-Analyse: Die F3-Generation wurde durch Verpaarungen von, für das rekombinierte DSG2-Allel homozygoten Nachkommen der F2-Generation gezüchtet. Nach den Mendel'schen Gesetzen der Vererbung sind für das rekombinierte DSG2-Allel ($DSG2^{delE4-E6}$) nur noch homozygote Nachkommen zu erwarten. Zygote loxP-Allel: Bei den homozygoten Tieren bildet sich weder ein PCR-Produkt für das wildtypische DSG2-Gen noch ein PCR-Produkt für das „ <i>gefloxte</i> “ DSG2-Gen. $DSG2^{delE4-E6}$: Bei allen homozygoten Nachkommen bildet sich eine Bande für das rekombinierte DSG2-Allel.	56
Abbildung 15: PCR-Analyse der zelltypspezifische Rekombination des DSG2-Lokus: Es wurden Gewebeproben aus Herz, Dünndarm, Dickdarm, Leber und Schwanz aus einer konstitutiven $DSG2^{delE4-E6}$ -Mutante, einer mittels Tamoxifen über 5 aufeinanderfolgende Tage induzierten konditionalen Mutante und einer nicht-induzierten konditionalen Mutante entnommen und mittels PCR-Analyse auf eine erfolgreiche Rekombination des DSG2-Allels ($DSG2^{delE4-E6}$) überprüft. Wie zu erwarten, kann bei der $DSG2^{delE4-E6}$ -Mutante in allen Geweben ein PCR-Produkt des rekombinierten DSG2-Lokus nachgewiesen werden. Bei der konditionalen Mutante kann lediglich ein PCR-Produkt des rekombinierten Lokus in der DNA-Probe des Herzens detektiert werden. Die DNA-Proben aus der Kontrollmaus zeigt in keinem Fall eine Rekombination des DSG2-Allels. Für die Kontrolle der Intaktheit der DNA dient der Nachweis von GAPDH.	57
Abbildung 16: RT-PCR-Analyse zur Detektion der rekombinierten mRNA: Die rekombinierte mRNA wurde mittels RT-PCR in folgenden Tieren nachgewiesen: in einer homozygoten konstitutiven $DSG2^{delE4-E6}$ -Mutante, die in allen Geweben den rekombinierten DSG2-Lokus trägt und in über 5 Tagen und 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten (homozygote $DSG2^{loxP}$ -Tiere). Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte (Injektion von Öl) konditionale Mutante. Nachdem Töten der Tiere wurden Gewebeproben vom Herzen der Tiere entnommen. Aus diesen Proben wurde Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA	

- umgeschrieben. Diese cDNA diene als Matritze für sequenzspezifische Primer, wodurch in einer PCR-Analyse das wildtypische und das kleinere rekombinierte PCR-Produkt detektiert werden konnte. (A) Nach der Rekombination wird ein deutlich kleineres RNA-Fragment gebildet, dem die drei Exone 4-6 fehlen (B) Entsprechend bilden sich zwei unterschiedlich große PCR-Produkte: im Fall der Negativkontrolle entsteht eine Bande für die wildtypische RNA (685 bp) und im Fall der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und der induzierten Rekombination des DSG2-Lokus lässt sich lediglich noch eine Bande für die verkürzte mRNA nachweisen (211 bp). 59
- Abbildung 17: Western-Blot-Analyse des rekombinierten Dsg2-Proteins: Es wurden Proteinextrakte aus den Herzwesen einer über 5 Tage bzw. 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}- Mutante gewonnen. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte (mit Öl behandelte) konditionale Mutante. Die Proben wurden mit einem Dsg2-Antikörper und einem α -Aktin-Antikörper, als Ladekontrolle inkubiert. Im Anschluss wurden die Intensität und die Größe der entstandenen Banden verglichen. Es fällt auf, dass die Intensität der Bande nach einer Induktion über 5 Wochen deutlich abnimmt. In der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante ist kein Dsg2-Protein mehr nachweisbar 60
- Abbildung 18: Makroskopische Darstellung der veränderten Herzen: Die Herzen einer, mit Öl behandelten, nicht-induzierten konditionalen Mutante, einer über 5 aufeinanderfolgende Tage induzierten konditionalen Mutante und einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante wurden bei der Obduktion entnommen und fotografiert. In dieser vergleichenden Darstellung kann man sowohl die deutliche Größenzunahme der Herzen insgesamt, als auch die starke Vergrößerung der Herzohren erkennen. 61
- Abbildung 19: Darstellung der konstitutiv mutierten Herzen *In Situ* und *Ex Situ*: Dargestellt sind die Herzen von konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten. Als Kontrolle diente eine wildtypische Maus. (A) *In Situ*-Aufnahme eines wildtypischen Herzens. Die Lunge ist deutlich zu erkennen. Die Herzspitze ragt nach links gerichtet in den Brustraum. Die Herzohren liegen eng auf beiden Seiten den entsprechenden Vorhöfen an. Die Oberfläche des Herzens ist glatt und glänzend. (A') *Ex Situ*-Aufnahme des Herzens aus A. (B) *In Situ*-Aufnahme einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Deutlich zu erkennen sind die weißen Strukturen auf dem linken Ventrikel (Pfeile), einer Bindegewebedurchsetzung der Ventrikelwand. Weiterhin ist eine Vergrößerung des gesamten Herzens erkennbar. Beide Ventrikel haben ihre Form verloren und erscheinen ausgebeult. Auch beide Herzohren sind deutlich vergrößert. (B') *Ex Situ*-Aufnahme einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Beschreibung: siehe B (C) Der Herzbeutel dieser Maus ist gefüllt mit koaguliertem Blut. Diese Maus starb an einer Herztamponade durch einen Riss in der rechten Ventrikelwand. (C') *Ex Situ*-Aufnahme des Herzens aus C..... 62
- Abbildung 20: Übersicht über die histologischen Veränderungen der transgenen Mäuseherzen: Gezeigt werden die Herzen von über 5 Tagen bzw. 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten und einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante in einer Übersichtsaufnahme (HE-Färbung) und zwei unterschiedlichen Detailaufnahmen (AZAN- und HE-Färbung). Als Kontrolle diente ein nicht-induziertes, mit Öl behandeltes Tier (Tamoxifen -). Bemerkenswert sind die deutlich erweiterten rechten Ventrikel in den Übersichtsaufnahmen bei allen transgenen Tieren (Pfeile) (B-D). In der HE-gefärbten Detailaufnahme sind bei der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante extreme Bindegewebszubildungen zu erkennen (D'), die in der AZAN-Färbung (D'') blau dargestellt sind (Pfeile). Die Veränderungen in den konditionalen Mutanten beginnen nach 5 Tagen Tamoxifenbehandlung mit einem Verlust der Zellgrenzen und einem

„Auseinanderreißen“ der Zellen (B'). Der entstehende „Hohlraum“ wird mit Bindegewebe ausgefüllt (Pfeil in der AZAN-Färbung nach 5 Tagen Tamoxifen +). Nach 5 Wochen Induktion ist der Ersatz des Herzmuskelgewebes durch Bindegewebe deutlich fortgeschritten (C'). Die in der AZAN-Färbung (C'') rot dargestellten Herzmuskelzellen erscheinen wie Schollen im blaugefärbten Bindegewebe (Pfeile).

Größenbalken: 100 µm 65

Abbildung 21: Histologische Veränderungen der konditionalen Mutanten: Gezeigt werden die veränderten Herzen von über 5 Tagen bzw. 5 Wochen induzierten konditionalen Mutanten. Als Kontrolle diente ein nicht-induziertes Tier (Tamoxifen -). (A-A'') Kontrolle in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen; die Zellen liegen dicht nebeneinander und es befindet sich kaum Bindegewebe zwischen den Zellen. Die Kerne liegen zentral geordnet in den Zellen (B) Übersichtsaufnahme einer 5 Tage induzierten konditionalen Mutante. Die Zellen „reißen“ auseinander (Pfeil), es bilden sich „Kernhaufen“ überall im Gewebe und erste Bindegewebszubildungen sind zu erkennen (aufgehellte Bereiche) (B'-B''). Die Detailaufnahmen einer 5 Tage induzierten Mutante zeigen auseinandergerissene Zellen und Bindegewebszubildungen (Pfeil) (C-C'') Bilder einer über 3 Wochen induzierten konditionalen Mutante (C') Die Zellen sind noch deutlicher „zerrissen“ (Pfeil) (C'') Die Zellgrenzen gehen verloren (Pfeil) (D-D'') Aufnahmen einer über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante, hier sind besonders die extremen Bindegewebszubildungen auffällig (Pfeile) (D'') In der Detailaufnahme sieht man wieder die „Kernanhäufungen“ (Pfeile) und den Ersatz des Herzmuskelgewebes durch Bindegewebe 66

Abbildung 22: Übersicht über die histologischen Veränderungen der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten:

Gezeigt werden HE-Schnitte der Herzen von konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten. (A) Diese Übersichtsaufnahme zeigt den Ersatz des Herzmuskelgewebes durch Bindegewebe, welches uneinheitlich in die Ventrikelwand eingelagert ist (Pfeile). (B) Hier wird eine Vergrößerung aus A gezeigt, in der das Bindegewebe noch deutlicher von dem intakten Muskelgewebe unterscheidbar ist (Pfeile). (C) Gezeigt wird eine noch stärker vergrößerte Aufnahme der betroffenen Bereiche. Zusätzlich zum Bindegewebe sind rot-braune, schollenartige „Plaques“ zu erkennen (Pfeil), bei denen es sich um die untergehenden Herzmuskelzellen handelt. (D) Diese Detailaufnahme zeigt die, in Bindegewebe eingelagerten (großer Pfeil), untergehenden Herzmuskelzellen (kleiner Pfeil)..... 68

Abbildung 23: Histologische Veränderungen der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}- Mutanten (HE-Färbung): (A) Übersichtsaufnahme der Ventrikelwand mit Bindegewebszubildungen. Auffällig sind die deutlich hervorgetretenen Blutgefäße in der Wand (Pfeile). (B) Vergrößerte Aufnahme der Blutgefäße (große Pfeile); weiterhin schmutzig-braune Ablagerungen im Gewebe, die als Hämosiderin bezeichnet werden und durch den Myoglobinabbau zustande kommen (Pfeilkopf). (C-D) Hier sind wieder der Verlust der Zellgrenzen (Pfeilkopf) und der schollige Zerfall der Herzmuskelzellen (Pfeil) zu erkennen. (E) Der Hohlraum, der durch den scholligen Zerfall der Herzmuskelzellen entsteht, wird in einem ersten Schritt mit Fibrin (Pfeil) ausgefüllt, welches sich dann in mehreren Schritten zu Bindegewebe organisiert (F-I) (F) Hier sieht man in der Mitte noch, den mit Fibrin aufgefüllten Hohlraum (Pfeil) und am Rand bereits die erste, weitmaschige Bindegewebsorganisation (Pfeilkopf) (G) Detailaufnahme der ersten weitmaschigen Bindegewebsorganisation mit eingelagerten Fibroblastenkernen. (H-I) In diesen Aufnahmen wird die fortgeschrittene Metaplasie des Herzmuskelgewebes in weniger differenziertes Bindegewebe (Pfeile) dargestellt 69

- Abbildung 24: Nachweis von apoptotischen Zellbestandteilen in konditionalen Mutanten nach 5 aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifenbehandlung: Der Nachweis apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe der ISOL-Färbung durchgeführt. Der Mechanismus beruht auf dem Enzym T4-DNA-Ligase, das die freien Enden der Proben-DNA mit denen von biotinylierten Oligonukleotiden verknüpft. Durch die Bindung an ein Peroxidase-Konjugat wird ein Substrat umgesetzt. Die Reaktion wurde mittels Durchlichtmikroskopie sichtbar gemacht. (A) Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante (Tamoxifen -). Hier erkennt man die blass gefärbten Herzmuskelzellen mit ihren zentralen Kernen. (B) Übersichtsaufnahme der Kammerwand mit apoptotischen Zellen, die sich in der ISOL-Färbung als braune Plaques darstellen (Pfeil). Überall in der Kammerwand sind Zellbereiche zu finden, die Apoptose begehen. (C-D) Vergrößerte Aufnahmen der Apoptose. 72
- Abbildung 25: Nachweis von apoptotischen Zellbestandteilen in konditionalen Mutanten nach 5 Wochen Tamoxifenbehandlung: Der Nachweis apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe der ISOL-Färbung durchgeführt. (A) Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante. Hier erkennt man die blass gefärbten Herzmuskelzellen mit ihren zentralen Kernen. (B) In der Übersichtsaufnahme sind, im Vergleich zu Abbildung 24 nur sehr wenige apoptotische Färbungen (Pfeile) zu finden. (C-D) Die Vergrößerungen von B zeigen, dass es sich bei den braunen Plaques, um positive Reaktionen der ISOL-Färbung handelt und nicht um Artefakte. Allerdings ist die Intensität nicht mit der Intensität von Abbildung 24 und 26 zu vergleichen. 73
- Abbildung 26: Nachweis von apoptotischen Zellbestandteilen in den konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten: Erklärung des Mechanismus: siehe Abbildung 24 und 25 (A) Kontrolle (siehe Abbildung 24 bzw. 25). (B) In dieser Übersichtsaufnahme derselben konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante aus Abbildung 22 kann man deutlich erkennen, dass die schollig-zerfallenden Herzmuskelzellen durch programmierten Zelltod zugrunde gehen. Die zerfallenen Zellen zeigen in der ISOL-Färbung eine positive Reaktion und färben sich schmutzig-braun. (C-D) Detailaufnahmen der untergehenden Herzmuskelzellen (Pfeile)..... 74
- Abbildung 27: Dsg2-Markierung im Herzen: Untersucht wurden über 5 Tage bzw. 5 Wochen induzierte konditionale Mutanten, eine nicht-induzierte konditionale Kontrollmutante und konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutanten. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert und zur Antigendemaskierung in Zitratpuffer gekocht. Anschließend wurden die Herzgewebeschnitte mit einem Dsg2-Antikörper und dem Zweitantikörper (Cy3- α -rb) inkubiert. Auffällig ist die Abnahme des Dsg2-Signals. In der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante sind nur noch ganz vereinzelt Glanzstreifen angefärbt. Größenbalken: 50 μ m 75
- Abbildung 28: Markierung der Glanzstreifen durch die desmosomalen Proteine Plakoglobin (PG), Plakophilin 2 (PP2) und Desmoplakin (DSP): Untersucht wurden konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutanten und über 5 Tage induzierte konditionale Mutanten. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert und zur Antigendemaskierung in Zitratpuffer gekocht. Anschließend wurden die Herzgewebeschnitte mit einem DSP- und einem PP2-Antikörper inkubiert. Das Gewebe für die PG-Inkubation wurde mittels Isopentan fixiert. Die Signale von Plakophilin 2, Plakoglobin und Desmoplakin erscheinen unverändert. Größenbalken: 50 μ m 77
- Abbildung 29: Markierung der Zelladhäsionsproteine N-Cadhein, β -Catenin und Connexin 43 in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine nicht-induzierte

- konditionale Kontrollmutante und eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Die Gewebe für die Inkubation mit dem N-Cadherin- und dem β -Catenin-Antikörper wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Das Gewebe für die Cx 43-Inkubation wurde mittels Isopentan fixiert. Besonders auffällig ist die starke Abnahme des Connexin 43-Signals in der konditionalen und der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Da Connexin 43 ein wichtiger Bestandteil der Gap junctions ist, sind bei diesen Tieren erhebliche Probleme in der Erregungsweiterleitung (Arrhythmien) zu erwarten. Die Signale der N-Cadherin- und β -Catenin-Markierung zeigen keine Veränderung. Größenbalken: 50 μ m 79
- Abbildung 30: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von Plakophilin 2 (PP2) und Desmoglein 2 (Dsg2) in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine 5 Wochen induzierte konditionale Mutante und eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Die Gewebeschnitte wurden gleichzeitig mit einem Antikörper gegen Dsg2 und einem Antikörper gegen PP2 inkubiert. Deutlich zu erkennen ist die starke Abnahme des Dsg2-Signals und die leichte Abnahme des PP2-Signals. Während in der Kontrolle und nach 5 Tagen Tamoxifenbehandlung noch eine deutliche Kolokalisierung der beiden Proteine zu erkennen ist (gelbe Färbung des Signals), nimmt diese nach 5 Wochen Induktion ab (grünere Färbung). In der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante ist keine Kolokalisierung von Dsg2 und PP2 mehr nachweisbar (grüne Färbung der Glanzstreifen). Größenbalken: 50 μ m 81
- Abbildung 31: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von Desmoplakin (DSP) und Desmoglein 2 (Dsg2) in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine 5 Wochen induzierte konditionale Mutante und eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Die Gewebeschnitte wurden gleichzeitig mit einem Antikörper gegen Dsg2 und einem Antikörper gegen DSP inkubiert: Deutlich zu erkennen ist die starke Abnahme des Dsg2-Signals und die leichte Abnahme des DSP-Signals. Während in der Kontrolle und in den konditionalen Mutanten noch eine Kolokalisation der beiden Proteine zu erkennen ist (gelbe Färbung des Signals), nimmt diese in der DSG2^{delE4-E6}-Mutante deutlich ab (grünere Färbung der Glanzstreifen). Größenbalken: 50 μ m 82
- Abbildung 32: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von N-Cadherin und Desmoglein 2 (Dsg2) in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine 5 Wochen induzierte konditionale Mutante und eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Die Gewebeschnitte wurden gleichzeitig mit einem Antikörper gegen Dsg2 und einem Antikörper gegen N-Cadherin inkubiert: Deutlich zu erkennen ist die leichte Zunahme des N-Cadherin-Signals. Während in der Kontrolle und in den konditionalen Mutanten noch eine Kolokalisation der beiden Proteine zu erkennen ist (gelbe Färbung des Signals), nimmt diese in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante deutlich ab (grünere Färbung der Glanzstreifen). Größenbalken: 50 μ m 83
- Abbildung 33: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von β -Catenin und Desmoglein 2 (Dsg2) in den Glanzstreifen: Untersucht wurde eine über 5 Tage induzierte konditionale Mutante, eine 5 Wochen induzierte konditionale Mutante und eine konstitutive DSG2^{delE4-E6}-Mutante. Die Gewebe wurden in 2 % Paraformaldehydlösung (AFA) fixiert. Die Gewebeschnitte wurden gleichzeitig mit einem Antikörper gegen Dsg2 und einem Antikörper gegen β -Catenin inkubiert: Während in der Kontrolle und in den

- konditionalen Mutanten noch eine Kolokalisierung der beiden Proteine zu erkennen ist (gelbe Färbung des Signals), nimmt diese in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante deutlich ab (grünere Färbung der Glanzstreifen). Größenbalken: 50 µm..... 84
- Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Glanzstreifen der transgenen Mäuse: Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante (Tamoxifen -). Hier sieht man in der „*area composita*“ der Glanzstreifen deutlich die Desmosomen zwischen den Fascia adhaerens liegen (Pfeile). Nach einer fünftägigen Behandlung mit Tamoxifen liegen zwischen den Fascia adhaerens weiterhin Desmosomen in der „*area composita*“. Nach einer fünföchigen Behandlung mit Tamoxifen wird es schwieriger Desmosomen in den Glanzstreifen zu finden. Bei der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante lassen sich keine Desmosomen mehr finden. Die „*area composita*“ der Glanzstreifen des Herzens setzt sich nun vollständig aus Fascia adhaerens zusammen (Pfeilkopf). Größenbalken: 250 nm 86
- Abbildung 35: Elektronenmikroskopische Darstellung der Mitochondrien und Sarkomere von konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutanten: (A) Mitochondrien im Herzgewebe einer wildtypischen Maus vom Crista-Typ (Pfeil) (B) Mitochondrien im Herzgewebe einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante (Pfeil) (C) „Abgerissenes“ Sarkomer im Herzgewebe einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante. (D) Zerstörte Sarkomere (Pfeil). Größenbalken: 500 nm..... 87
- Abbildung 36: Western-Blot Analyse von Cyclin D1: Es wurden Proteinextrakte aus den Herzen einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und aus konditionalen Mutanten gewonnen, die jeweils 5 Tage bzw. 5 Wochen mit Tamoxifen behandelt wurden. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen Cyclin D1 inkubiert. Der Vergleich der Bandenstärke, der über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante mit der Kontrolle zeigt einen deutlichen Unterschied. Die Banden der Mutanten zeigen eine starke Zunahme in der Strahlkraft. 89
- Abbildung 37: Western-Blot-Analyse des desmosomalen Proteins Plakophilin 2: Es wurden Proteinextrakte aus den Herzen einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und aus konditionalen Mutanten gewonnen, die jeweils 5 Tage bzw. 5 Wochen mit Tamoxifen behandelt wurden. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante. Die Proben wurden mit einem Plakophilin 2-Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein Aktin-Antikörper. Die Proteinextrakte der Mutanten und der Aktinkontrolle zeigen jeweils eine Bande vergleichbarer Intensität und Größe. 89
- Abbildung 38: Western-Blot-Analysen der Zelladhäsionsproteine Plakoglobin und β-Catenin: Es wurden Proteinextrakte aus den Herzen einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und aus konditionalen Mutanten gewonnen, die jeweils 5 Tage bzw. 5 Wochen mit Tamoxifen behandelt wurden. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante. Die Proben wurden mit einem Plakoglobin- und einem β-Catenin-Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein Aktin-Antikörper. Im Anschluss wurden die Intensität und die Größe der entstandenen Banden verglichen. Auffällig ist eine geringfügige Zunahme der Strahlkraft der Plakoglobin-Bande und eine geringfügige Abnahme der β-Catenin- Bandenintensität in der konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante. 89
- Abbildung 39: Western Blot-Analyse des Enzyms p38 MAPK: Es wurden Proteinextrakte aus den Herzen einer konstitutiven DSG2^{delE4-E6}-Mutante und aus konditionalen Mutanten gewonnen, die jeweils 5 Tage bzw. 5 Wochen mit Tamoxifen behandelt wurden. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte konditionale Mutante. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen das Protein p38 MAPK inkubiert. Als

Ladekontrolle diente ein Aktin-Antikörper. Im Anschluss wurden die Intensität und die Größe der entstandenen Banden verglichen. Die Proteinextrakte der nicht-induzierten und der über 5 Tage induzierten Proben zeigen jeweils eine Bande vergleichbarer Intensität und Größe. Die Banden der über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und die der konstitutiven DSG2 ^{delE4-E6} -Mutante zeigen ein geringeres apparentes Molekulargewicht. Die gleichmäßige Intensität der Aktinbanden belegt die gleichmäßige Proteinkonzentration in den Proben.	90
Abbildung 40: Western Blot-Analyse des Enzyms p38/ ^p (phospho) MAPK: Proben: siehe Abbildung 39. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen das Protein Phospho p38 MAPK inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein Aktin-Antikörper. Im Anschluss wurden die Intensität und die Größe der entstandenen Banden verglichen. Die Proteinextrakte der nicht-induzierten und der über 5 Tage induzierten Proben zeigen jeweils eine Bande vergleichbarer Intensität und Größe. Die Banden der über 5 Wochen induzierten konditionalen Mutante und die der konstitutiven DSG2 ^{delE4-E6} -Mutante zeigen ein geringeres apparentes Molekulargewicht. Die gleichmäßige Intensität der Aktinbanden belegt die gleichmäßige Proteinkonzentration in den Proben.	90

9. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammonium-Persulfat
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
cDNA	komplementäre DNA
DAPI	4, 6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
Dsg2	Desmoglein 2
DSP	Desmoplakin
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ECL	“ <i>enhanced chemi-luminescence</i> ”
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
g	Erdbeschleunigung
H ₂ O _{a.i.}	Wasser zur Injektion
H ₂ O _{dd}	Wasser bidestilliert
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasen
kD	Kilo Dalton
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
loxP	“locus of crossover x in P1“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PG	Plakoglobin
PP2	Plakophilin 2
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Einheiten (<i>units</i>)
v/v	Volumen pro Volumen („Volumenprozent“)
w/v	Gewicht pro Volumen („Gewichtsprozent“)
wt	Wildtyp

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Rudolf Leube für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, für seine tolle Unterstützung, seine Anregungen und seine Begeisterungsfähigkeit.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Martin Bergmann für seine Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Bastian Holthöfer, der mich während der gesamten Arbeit in allen technischen und fachlichen Dingen beraten hat, mich geduldig eingearbeitet hat und mich in einer unglaublich kompetenten Art unterstützt hat!

Ich danke, insbesondere Ursula Wilhelm für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Beratung in allen Labortechniken und ganz besonders für die Ausführung der Western Blots.

Ich bedanke mich weiterhin bei Ursula Disque-Kaiser und Ursula Kirmair für ihre Unterstützung und Einweisung in die Techniken der Histologie und Immunfluoreszenzmikroskopie und bei Ilse von Graevenitz für die Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Lorenz für die tolle Betreuung meiner Mäuse.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen Kollegen für ihre Hilfsbereitschaft und ihr offenes Ohr bedanken, denn durch sie hat mir die Arbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie an Johannes-Gutenberg-Universität solchen Spaß gemacht!

Erklärung

Hiermit erkläre ich: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Valérie Hofe

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

I S B N 3 - 8 3 5 9 - 5 4 4 5 - 8



9